

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

# **Konditionierung von Titanoberflächen mit physikalischem Plasma**

—

## **Einfluss auf die initiale Besiedelung von Gingiva- fibroblasten**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde*

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2014

vorgelegt von:

Constanze Charlotte Mayer

geb. am: 02.08.1984 in Freiburg im Breisgau

Tag der Promotion:

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Rupf

2. Berichterstatter:

## ***Widmung***

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Deutsche Zusammenfassung .....	1
1.2	Abstract.....	2
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
2.1	Stellenwert der Implantologie.....	4
	Implantate .....	4
	Oberflächenbeschaffenheit .....	6
	Grenzfläche zwischen Implantat und umliegendem Gewebe.....	7
2.2	Zahnhalteapparat.....	8
	Gingivagewebe .....	9
	Zelladhäsion auf Oberflächen / Fokalkontakte.....	11
2.3	<i>In-vitro</i> -Modelle für die Bewertung von Implantatoberflächen .....	12
	Zellmodell der Untersuchung .....	12
2.4	Periimplantäre Erkrankungen .....	15
	Therapie periimplantärer Erkrankungen.....	16
2.5	Physikalisches Plasma .....	19
	Plasma in der Implantologie .....	21
	Grundlagenuntersuchungen der Arbeitsgruppe .....	22
2.6	Ziel der Arbeit.....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>25</b>
3.1	Zellbiologische Arbeitsmethoden .....	25
	Gingivafibroblasten .....	25

	<i>In-vitro</i> -Kultivierung .....	26
3.2	Versuchsaufbau.....	28
	Prüfkörper .....	28
	Plasmaquelle .....	28
	Bearbeitungsparameter .....	30
	Applikation der Zellen auf die Prüfkörper.....	31
	Kultivierung .....	33
3.3	Auswertung.....	33
	Zellattachement, -verteilung und -morphologie .....	33
	Biologische Aktivität .....	37
	Statistische Auswertung.....	38
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
4.1	Zellattachement, Zellverteilung.....	39
4.2	Zellmorphologie .....	61
4.3	Biologische Aktivität .....	70
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>80</b>
5.1	Grundlagenuntersuchungen der Arbeitsgruppe .....	81
5.2	Versuchsmodell und Durchführung.....	83
5.3	Analyse der Ergebnisse.....	83
5.4	Kritische Betrachtung der Ergebnisse .....	86
5.5	Therapeutisches Potential – Ausblick.....	90
5.6	Schlussfolgerungen.....	91
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>

<b>7</b>	<b>PUBLIKATION / DANKSAGUNG .....</b>	<b>107</b>
7.1	Publikation.....	107
7.2	Förderung.....	107
7.3	Danksagung .....	108
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>110</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Aluminiumoxid
ALP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
ASTM	American Society for Testing and Materials
BOP	Blutung auf Sondieren
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CHX	Chlorhexidindiglukonat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CP	commercially pure
DAPI	4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. g.	Exempli gratia
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
e. V.	eingetragener Verein
FBS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HCl	Chlorwasserstoff
HMDS	Hexamethyldisilazan
IgG	Immunglobulin G
IOM	Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung

IZI	Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie
maTi	maschinierter Titanprobe
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
PBS	Phosphate Buffered Saline
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
O	atomarer Sauerstoff
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
O <sub>3</sub>	Ozon
OH	Hydroxidion
REM	Rasterelektronenmikroskopie
sccm	Standard-Kubikzentimeter (Gasfluss)
S2	Schutzstufe 2
SD	Standardabweichung
SLA	sandblasted and acid-etched surface
TiO	Titanoxid
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
TiO <sub>3</sub>	Titantrioxid
Triton-X	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) <sub>x</sub>
Tween 20	Poly(oxyethylen) <sub>x</sub> -Sorbitan-Monolaurat
UV-Strahlung	Ultraviolettstrahlung
vs.	versus
WST-1	Water soluble Tetrazolium
Wt. %	Gewichtsprozent
z.B.	z.B.



# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

Die Behandlung der Periimplantitis ist entscheidend für den langfristigen Erhalt zahnmedizinischer Implantate. Biofilme spielen neben weiteren Faktoren eine bedeutende Rolle bei der Entstehung einer Periimplantitis. Die Bearbeitung von Titanoberflächen mit kaltem atmosphärischem Plasma ermöglicht die kontaktfreie Destruktion von Biofilmen, ohne dabei die Oberflächentextur des Titans zu verändern. Zusätzlich kommt es zu einer verbesserten Oberflächenbenetzbarkeit, die als positiv für eine zelluläre Besiedlung angesehen wird. Die Oberflächenbehandlung von Implantaten mit kaltem atmosphärischem Plasma könnte somit eine alternative Therapieoption für die Periimplantitis darstellen.

Atmosphärische Plasmen werden durch die Anregung von Edelgasen mittels gepulster Mikrowelle erzeugt. Sie bestehen aus Ionen, Elektronen und Neutralteilchen. Durch Beimischung von Reaktivgasen oder durch Eindiffundieren von Umgebungsluft können im Plasma Radikale erzeugt werden. Kaltes atmosphärisches Plasma kann so reguliert werden, dass es am Strahlenauftrittspunkt eine Temperatur von weniger als 40 °C aufweist.

Das Ziel der Studie war die Untersuchung des Einflusses der Konditionierung von Titanoberflächen durch physikalisches Plasma auf das Besiedelungsverhalten primärer humaner Gingivafibroblasten. Dazu wurden Behandlungszeiten der Titanoberflächen von wenigen Sekunden gewählt, um vergleichbare Zeiten, wie sie in der zahnmedizinischen Praxis angewendet würden, zu simulieren.

Nach umfangreichen Voruntersuchungen wurden insgesamt 120 polierte oder mikrostrukturierte Titanscheiben als Prüfkörper verwendet. Ein Teil der Prüfkörper ( $n = 84$ ) wurde mit Plasma bestrahlt, während der restliche Teil der Proben ( $n = 36$ ) als Kontrollen mitgeführt wurde. Das Plasma wurde mit einer gepulsten Mikrowelle (2,45 GHz) erzeugt. Als Trägergas wurde Helium, als Reaktivgase Sauerstoff und Stickstoff, genutzt. Der Abstand zu den Prüfkörpern wurde auf 2 mm, die Pulslänge auf 5  $\mu$ s, die Pulsleistung auf 300 W und die mittlere Leistung des Mikrowellengenerators auf 5 W festgelegt. Der Gasfluss wurde mit 2 Litern Helium pro Minute und eine Bearbeitungszeit von 1,25 s/mm<sup>2</sup> gewählt. Anschließend wurden auf allen Titanscheiben Gingivafibroblasten kultiviert. Die *In-vitro*-Kultivierung erfolgte für 4, 12 und 24 Stunden. Als Nährmedium wurde DMEM-Flüssigmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) verwendet. Die Analyse des Kulturverhaltens der Fibroblasten erfolgte mit-

tels Fluoreszenzmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie und zellbiologischen Tests. Fokalkontakte wurden durch Vinculin-Fluoreszenz dargestellt.

Sowohl fluoreszenz- als auch rasterelektronenmikroskopisch zeigten sich Unterschiede für die Besiedelung der Titanoberflächen. Die bestrahlten Proben wiesen nach 4 Stunden ein gleichmäßiges Wachstum und eine flächigere Zellmorphologie verglichen mit den mitgeführten Kontrollen auf. Dies bestätigte sich nach 12 und 24 Stunden. Auch die Bedeckung der Prüfkörper stellte sich während der gesamten Kultivierungsdauer auf den bestrahlten Titanproben als homogener und dichter dar. Fokalkontakte zeigten sich durch die Plasmabestrahlung signifikant beeinflusst. Die Gingivafibroblasten auf den bestrahlten Prüfkörpern wiesen eine höhere Anzahl von Fokalkontakten auf. Die Plasmakonditionierung der Titanprüfkörper beeinflusste nicht das biologische Verhalten der Fibroblasten.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Titanoberflächen mit kaltem atmosphärischem Plasma die initiale Besiedelung mit Gingivafibroblasten fördert. Die gewählten Parameter erlaubten eine Bearbeitung von Titanproben mit unterschiedlicher Oberflächenmorphologie bei biologisch akzeptablen Temperaturen.

### 1.2 Abstract

The treatment of peri-implantitis is essential for the long-term success of dental implants.

Biofilms play an important role in the development of peri-implantitis as well as other factors.

The treatment of titanium surfaces with cold atmospheric plasma allows the contact-free destruction of biofilms, without altering the surface texture of the titanium. In addition, there is an improved surface wettability, which is considered to be positive for cell colonization. The treatment of implants with cold atmospheric plasma could thus represent an alternative treatment of peri-implantitis.

Atmospheric plasma is generated by excitation of noble gases by pulsed microwave. It consists of ions, electrons and neutrals. By adding chemically active gases or by infusion of ambient air reactive oxygen species are generated. The cold atmospheric plasma can be regulated so that it has a biologically acceptable temperature of less than 40 °C at the point of application.

The aim of the study was to investigate the influence of titanium surfaces conditioned by physical plasma on the colonization behavior of primary human gingival fibroblasts. Short treatment times were chosen in order to achieve comparable times as they would be applied in the dental practice.

After pilot studies to determine suitable parameters, a total of 120 polished or microstructured titanium disks were used as test specimens. A part of the test specimen ( $n = 84$ ) was irradiated with plasma, while the remaining samples ( $n = 36$ ) were included as controls. The plasma was created with a pulsed microwave (2.45 GHz). Helium was used as carrier gas, oxygen and nitrogen as reactive gases. The distance to the specimens was set to 2 mm, the pulse length of 5  $\mu$ s, the pulse power to 300 W and the mean power of the microwave generator to 5 W. The gas flow was set to be 2 liters of helium per minute and the work time with 1.25 s/mm<sup>2</sup>. Afterwards gingival fibroblasts were cultured on all titanium samples. The *In-vitro*-culture was carried out over 4, 12 and 24 hours. The culture medium DMEM-liquid medium (Dulbecco's Modified Eagle's medium) was used. The analysis of the cell-culture behavior was achieved by fluorescence microscopy, scanning electron microscopy and cell biological tests. Focal adhesions were demonstrated by vinculin staining.

Fluorescence microscopy as well as scanning electron microscopy showed differences for the colonization of the titanium surfaces. After 4 hours the plasma irradiated samples showed a more extensive growth and cell morphology in comparison to the irradiated samples without ignition of the carrier gas. This was confirmed after 12 and 24 hours. Also the cultivation of the specimens on the irradiated titanium samples was during the entire cultivation period more homogenous and dense. Focal adhesions were significantly influenced by the plasma irradiation. The gingival fibroblasts on the irradiated samples showed a higher number of focal adhesions. The plasma did not influence the biological behavior of the fibroblasts.

In this study it was demonstrated that treatment of titanium surfaces using cold atmospheric plasma promotes an initial colonization of gingival fibroblasts. The selected parameters allowed conditioning of titanium samples with different surface morphologies at biologically acceptable temperatures.

## 2 Einleitung

### 2.1 Stellenwert der Implantologie

Die Versorgung zahnloser und teilbezahnter Patienten mittels Implantaten ist in den vergangenen Dekaden ein fester Bestandteil der modernen Zahnmedizin geworden (Buser *et al.*, 1998).

Seit Brånemark in den 50er Jahren die Möglichkeit der Osseointegration von Titan im Kieferknochen beschrieb (Brånemark *et al.*, 1969), hat sich die zahnmedizinische Implantologie stetig weiterentwickelt und es kann eine immer größer werdende Anzahl von Patienten mit dentalen Implantaten versorgt werden. Dabei können auch schwierige Ausgangssituationen und Verhältnisse, gegebenenfalls nach vorheriger Knochenaugmentation, behandelt werden (Schliephake *et al.*, 1994; Small *et al.*, 1993).

Erfolgskriterien eines Implantates sind klinische Festigkeit, Entzündungs- und Schmerzfreiheit sowie ein periimplantärer Knochen ohne Osteolyse (Neukam, 2000). Die Abnahme des periimplantären Knochens sollte zwei Jahre *post implantationem* 0,2 mm nicht überschreiten (Neukam, 2000). Die aktuelle Forschung zu zahnmedizinischen Implantaten behandelt drei Fragestellungen. Diese beziehen sich auf das Implantatmaterial, die Oberflächentextur sowie die möglichen Komplikationen. Letztere stellen entzündliche Reaktionen rund um osseointegrierte Implantate dar. Man unterscheidet traumatische Sofortkomplikationen von mechanischer Überlastung und periimplantären Entzündungen, der Perimukositis und der Periimplantitis (Listgarten *et al.*, 1999). Die Problematik der Periimplantitis, ihrer Folgen und ihre Therapiemöglichkeiten spielen dabei zurzeit die bedeutendste Rolle und werden intensiv untersucht (Lindhe *et al.*, 2008).

#### ***Implantate***

Enossale Implantate dienen der Versorgung teilbezahnter und zahnloser Kiefer (Konsensuskonferenz Implantologie, 2002). Dabei geht es um die Wiederherstellung und Rekonstruktion funktioneller und ästhetischer Aspekte. Implantate sind einteilige oder mehrteilige Systeme. Bevorzugt werden mehrteilige Implantatsysteme, die aus einer im Knochen verankerten Schraube, einem die Schleimhaut perforierendem Aufbau (Abutment) und einer Suprakonstruktion aufgebaut sind.

Nach erfolgter Implantation ist die Besiedelung der Implantatoberfläche mit Zellen ein entscheidender Faktor für den Erfolg der Therapie. Es wird eine Verankerung des Implantates

durch Retention über Schraubenwindungen und durch Einwachsen von Knochenzellen in die Unebenheiten der Implantatoberfläche angestrebt. Das Verzahnen des Knochens mit dem Implantat stellt die stabilisierenden Eigenschaften gegenüber einwirkenden Kräften dar. Dieser funktionelle und strukturelle Verbund durch die Zellen wird als Osseointegration bezeichnet.

Da der Erfolg des Implantates von dessen Osseointegration abhängt, kommen heutzutage Implantatmaterialien, die sich durch eine hervorragende Biokompatibilität auszeichnen, wie Titan oder Zirkoniumoxid, zum Einsatz (Wilke *et al.*, 2002). So wird die Anlagerung körpereigener Zellen und damit ein besserer Verbund gefördert. Allerdings begünstigen sie auf gleiche Weise die Anlagerung von Biofilmen und Mikroorganismen (Bürgers *et al.*, 2010). Speziell Titan zeichnet sich durch eine sehr gute Bioverträglichkeit aus. Titan ist ein bioreaktives Metall, welches eine stabile passivierende Oxidschicht in Verbindung mit Sauerstoff ausbildet, die eine Absorption von Teilchen in das periimplantäre Gewebe verhindert und so eine Metallose vermeidet (Hugger *et al.*, 2006). Titan weist eine hohe Bruchfestigkeit und mechanische Belastbarkeit aus. Dentale Implantate bestehen aus medizinischem Reintitan. Unlegiertes Titan, sogenanntes Reintitan, wurde von der amerikanischen Standardisierungsorganisation ASTM (American Society for Testing and Materials) in vier unterschiedliche Klassen eingeteilt (CP Grades 1, 2, 3, 4). Die Einteilung der Klassen erfolgt nach der chemischen Zusammensetzung (Tabelle 1). Eine zunehmende Klasse bedeutet abnehmende Reinheit.

**Tabelle 1: ASTM F67-06; Standard Spezifikation for Unalloyed Titanium, for Surgical Implant Applications (UNS R50250, UNS R50400, R50550, UNS R507000)**

Element		Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Wasserstoff	H	0,015%	0,015%	0,015%	0,015%
Stickstoff	N	0,03%	0,03%	0,05%	0,05%
Kohlenstoff	C	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%
Sauerstoff	O	0,18%	0,25%	0,35%	0,40%
Eisen	Fe	0,2%	0,3%	0,3%	0,5%
Titan	Ti	Rest	Rest	Rest	Rest
(ASTM F67-06) Copyright © ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, United States.					

Die chemische Zusammensetzung, vor allem die Anteile von Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Wasserstoff und Eisen, bewirken die mechanischen Eigenschaften. Es ergeben sich für

Reintitan Grade 2 eine Mindest-Zugfestigkeit von 345 Megapascal und eine 0,2%-Dehngrenze von 275 Megapascal (DENTSPLY/Friadent).

Auf die Insertion der Implantate folgt typischerweise eine über mehrere Monate dauernde Einheilungsphase, bevor eine rotationssichere Steck-Schraubenverbindung aufgebracht wird. Dieses Abutment wird in das Innere des Implantates eingefügt. Es durchtritt die Schleimhaut und verbindet die Implantatschraube mit der später eingeschraubten oder zementierten Suprakonstruktion.

### ***Oberflächenbeschaffenheit***

Auf Titanoberflächen bildet sich wenige Stunden nach Bearbeitung eine stabile Oxidschicht aus. Dies geschieht unter Einwirkung von Sauerstoff, Wasser und Elektrolyten. Diese Schicht wird passivierende Oxidschicht genannt, da sie einen protektiven Charakter für das umgebende Gewebe besitzt. Sie besteht aus  $\text{TiO}$ ,  $\text{TiO}_2$  oder  $\text{TiO}_3$ . Da sie einen direkten Kontakt zwischen dem Metall und dem periimplantären Gewebe verhindert, wird sie auch als biologisch autonome Oberfläche bezeichnet. Chemische Rückstände auf der Titanoberfläche durch unterschiedlichste Bearbeitung wie beispielsweise Säureätzung, Sandstrahlen oder verbliebene Waschsubstanzen nach der Reinigung, können die Einheilung von Implantaten behindern und sogar zu Implantatverlust führen (Albrektsson *et al.*, 2007; Massaro *et al.*, 2002).

Um eine passivierende Oxidschicht auf der Implantatoberfläche herzustellen, gibt es zwei unterschiedliche Verfahren. Zum Einen besteht die Möglichkeit, mit Hilfe einer anodischen Oxidation, das heißt unter Anlegung einer Spannung in einem Elektrolyten, eine kontrollierte Oxidschicht zu erhalten. Eine weitere Möglichkeit ist die Plasmaoxidation. Dabei erfolgt eine Plasmareinigung der Titanoberfläche, bei der das Metall mittels Gasplasmastrahl bearbeitet wird. Beide Methoden sind dazu geeignet auf dem Implantat eine osteophile Oberfläche durch das Titanoxid zu schaffen (Hugger *et al.*, 2006).

Wichtig für die Osseointegration von Implantaten ist die Implantatoberflächentextur. Dabei spielt die Mikroretention eine herausragende Rolle. Diese kann durch unterschiedliche Verfahren erzielt werden. Dazu zählen ablative Verfahren wie z.B. Sandstrahlen, Säureätzung oder eine Kombination von beiden sowie additive Verfahren, wie beispielsweise die Titan-Plasma- und die Hydroxylapatit-Beschichtung. Der momentane „Goldstandard“ der Implantatoberflächenmodifikation ist die Kombination aus Sandstrahlen und thermischer Säureätzung (SLA = sandblasted and acid-etched surface) (Bornstein *et al.*, 2005; Cochran *et al.*, 2002). Dabei wird die Oberfläche zunächst mittels  $\text{Al}_2\text{O}_3$  Partikeln ( $\sim 250 \mu\text{m}$ ) bestrahlt, worauf eine

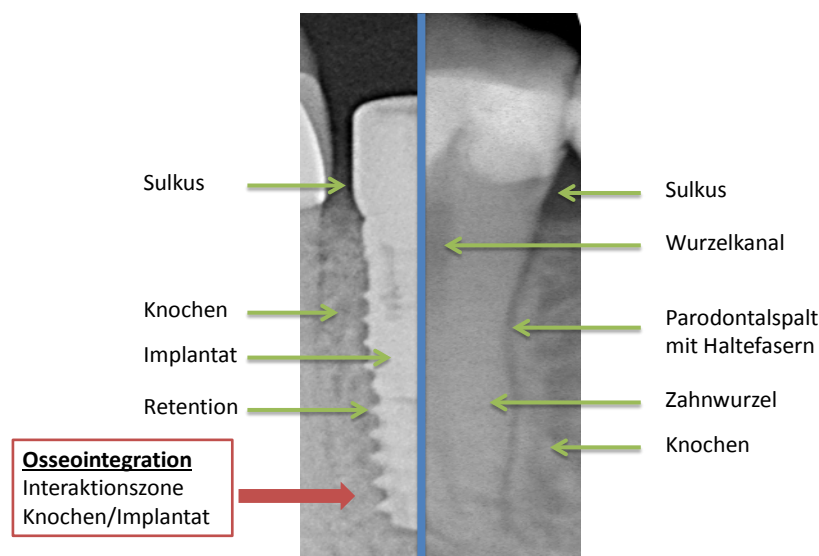
Säureätzung mit einer heißen HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Lösung folgt. Diese Behandlung bewirkt eine doppelte Mikrostrukturierung der Oberfläche: eine Porosität der Oberfläche (0,5 bis wenige µm) aufgelagert auf einer Mikrostrukturierung mit einer Tiefe von 20-50 µm (Massaro *et al.*, 2002). Durch das Ätzen werden gleichzeitig gelöste aber retinierte Partikel entfernt. Eine Weiterentwicklung der SLA Titanoberfläche (SLAactive) wird durch Behandlung in einer stickstoffhaltigen Atmosphäre und in saliner Lösung erreicht. So kann Kohlenstoffkontamination reduziert und die hydrophilen Eigenschaften der Implantatoberfläche verbessert werden (Rupp *et al.*, 2006).

### ***Grenzfläche zwischen Implantat und umliegendem Gewebe***

Die Oberfläche von Implantaten muss sowohl in der Makro- als auch Mikrostruktur so beschaffen sein, dass die optimale Anlagerung körpereigener Zellen und eine primäre Stabilität möglich sind. Die Mikroretention erfolgt über die Ausbildung einer osteophilen Oberfläche. Diese wird durch die Titanoxidschicht und die Oberflächenbeschaffenheit erreicht. Die Makroretention erfolgt durch Schraubenwindungen (Hugger *et al.*, 2006). Die Anhaftung epithelialer Zellen an die Implantatoberfläche dient als Abdichtung und Schutz gegen bakterielle Infektionen (Kawahara *et al.*, 1998). Der Erhalt periimplantärer Gingiva ist bedeutend, um möglichst reizfreie Schleimhautverhältnisse und eine gute Mundhygiene zu erreichen (Berglund *et al.*, 1991). Die erfolgreiche Verankerung im Knochen wird durch die Besiedelung der Oberfläche mit Osteoblasten erreicht. Das Ziel wäre der Aufbau eines stabilen Halteapparates, ähnlich dem natürlichen Zahnhalteapparat (Hermann *et al.*, 2000) (Abb. 1). Jedoch zeigen die verschiedenen beteiligten Zellarten, Osteoblasten, Gingivafibroblasten und Gingivaepithelzellen, differenzierte Interaktionsmuster mit der Titanoberfläche. Es stellt sich damit die Aufgabe, die Implantatoberfläche individuell für die einzelnen Zelltypen so zu variieren und zu modifizieren, dass sich eine bestimmte Zellart auf einem definierten Implantatabschnitt gut etablieren kann (Cochran *et al.*, 1994). Der natürliche Zahn zeigt ebenfalls unterschiedliche morphologische Abschnitte für die Anlagerung spezifischer Zelltypen. Untersuchungen zeigen, dass Osteoblasten bevorzugt auf mikrostrukturierten Implantatoberflächen wachsen (Novaes *et al.*, 2010; Masaki *et al.*, 2005), während Fibroblasten und Epithelzellen maschinierete Oberflächen bevorzugen (Yamano *et al.*, 2011; Rompen *et al.*, 2006; Könönen *et al.*, 1992). Weitere Studien konnten nachweisen, dass die Proliferation von osteoblastenartigen Zellen und die Produktion von Wachstumsfaktoren auf mikrostrukturierten Implantatoberflächen signifikant höher ist als an maschinieren (Aita *et al.*, 2009; Ogawa *et al.*, 2002). In der aktuellen Forschung wird der Schwerpunkt nach wie vor auf die Besiedelung der Implan-

tatoberfläche mit Osteoblasten gelegt, um die Osseointegration zu optimieren. Jedoch spielt auch die Interaktion zwischen Fibroblasten und Implantat eine besondere Rolle. Kommt es nicht zu einer Anlagerung von Bindegewebe um das Implantat, ist eine Abgrenzung gegen die Mikroorganismen der Mundhöhle nicht gegeben und die Infektionsgefahr des periimplantären Knochens ist erhöht (Rompen *et al.*, 2006). So ergibt sich als Ziel, eine differenzierte Implantatoberfläche zu gestalten, auf der alle beteiligten Zellen die bestmöglichen Voraussetzungen finden, um sich anzusiedeln.

## Vergleich Implantat / Zahn



**Abb. 1: Zahn (rechts) und Implantat - morphologische Gemeinsamkeiten und Unterschiede.**

Quelle: C. Mayer

## 2.2 Zahnhalteapparat

Der Zahnhalteapparat besteht aus dem Wurzelzement, der Wurzelhaut (Desmodont/Parodontalligament), der Gingiva (marginales Parodont) und dem Alveolarknochen. Dieser bildet die knöcherne Begrenzung des Zahnfaches, die sogenannte Alveole. Dabei geht die Wurzelhaut koronalwärts in die Gingiva über. Die Zähne sind beweglich in der Alveole über einen Faserapparat, den sogenannten Sharpey'schen Fasern, aufgehängt. Dies lässt eine feine Beweglichkeit von ungefähr 70 µm der Zähne zu (Radlanski, 2011). Das Parodont bildet eine funktionelle Einheit. Es schützt durch seine Struktur den Alveolarknochen vor einem Kontakt mit der multibakteriell besiedelten Mundhöhle. Dabei sind alle Teile des Parodonts eng miteinander verbunden, bzw. gehen ineinander über.

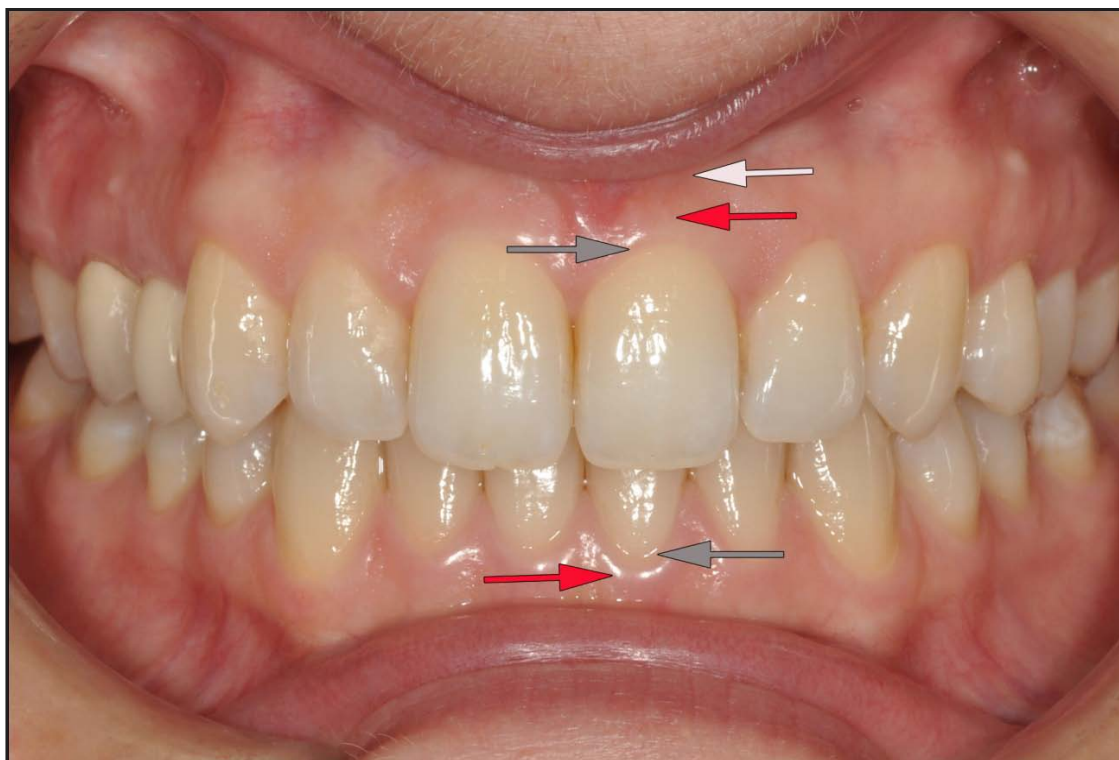


Die Gingiva besteht sowohl aus Teilen der Mundschleimhaut, wie auch aus Teilen des Zahnhalteapparates. Das der Mundhöhle zugewandte gingivale Sulkusepithel geht am Gingivarand in das dem Zahnschmelz anliegende orale Sulkusepithel über. In der Tiefe des Sulkus findet sich das sogenannte Saumepithel, welches aus einzelnen dünnen Epithelzellschichten besteht. Durch eine Basallamina liegt das Saumepithel dem Zahnschmelz oder dem Zement eng an. Dies schützt vor dem Eintritt von Bakterien und weiteren Noxen. Es existieren vom *Limbus alveolaris* ausgehende dentogingivale Haltefasern, die ein Umschließen des Zahnes mit Gingiva ermöglichen. Zusätzlich verlaufen verschiedene kollagene Haltefasern vom Zement zum Alveolarknochen sowie netzartig angeordnete Blutgefäße und Nerven. Weiterhin finden sich dort Zellen des Immunsystems (Radlanski, 2011).

### ***Gingivagewebe***

Die Gingiva bildet den äußersten Anteil des Zahnhalteapparates und liegt den koronalen Abschnitten des Alveolarknochens auf. Sie umgibt die Zähne und geht in die Alveolarschleimhaut, die Mundboden- oder die Gaumenschleimhaut über. Ihre Hauptaufgabe als Teil des Zahnhalteapparates ist die Verankerung und Stabilisierung der Zähne in der Alveole. Ihre Funktion als Teil der Mundschleimhaut besteht im Schutz des Alveolarknochens durch eine Abdichtung gegen das bakteriell besiedelte Mundhöhlenmilieu (Listgarten *et al.*, 1991). Dafür liegt sie mit dem Saumepithel zirkulär dem Zahn an. Zusätzlich existiert ein Kollagenfasergeflecht zwischen der supraalveolären Zementoberfläche und der Gingiva. Weitere kollagene Fasern verlaufen zirkulär um den Zahn herum sowie zwischen Periost und dem Alveolarknochen (Rateitschak *et al.*, 2004).

Die Gingiva ist von der Mukogingivallinie bis zur gingivalen Furche befestigt und unverschieblich (attached Gingiva), da sie durch Faserzüge direkt mit dem Periost verbunden ist. Koronalwärts schließt sich die sogenannte freie Gingiva bis zum Sulkus an (Abb. 2). Diese ist nicht mit dem Periost verwachsen, jedoch durch das Saumepithel mit der Schmelzoberfläche hemidesmosomal verbunden. Die Oberfläche der befestigten Gingiva zeichnet sich gestipelt, da einsproßende Kollagenfasern Impressionen in der gingivalen Oberfläche hinterlassen (Willershausen *et al.*, 2010; Hellwig *et al.*, 2009).



**Abb. 2:** Darstellung der gingivalen Anteile: Freie Gingiva (Grauer Pfeil), gingivale Furche (Roter Pfeil), befestigte Gingiva (weißer Pfeil).

Quelle: C. Mayer

Die Mundschleimhaut besteht aus mehreren Lagen. Außen liegend befindet sich ein mehrschichtiges Plattenepithel, das vier Schichten unterscheidet. Darunter befindet sich das Bindegewebe, die sogenannte *Lamina propria*. Diese besteht aus zwei Schichten: dem Papillarkörper, über den sie mit dem Epithel verbunden ist und in dem Kollagenfaserbündel locker verlaufen. Darunter findet sich eine derbe, zell- und kollagenreiche Bindegewebeschicht. In dieser verlaufen dicke, parallele Kollagenfaserbündel und Fibroblasten, Mastzellen sowie Leukozyten (Radlanski, 2011). Als Leukozyten sind vor allem T-Lymphozyten, T-Regulationszellen, T-Helferzellen und Makrophagen zu nennen.

Fibroblasten stellen den häufigsten Zelltyp im Bindegewebe der Gingiva dar. Sie spielen bei der Regeneration von Weichgewebsverletzung im Zahnhalteapparat sowie für die Erhaltung des Zahnhalteapparates eine bedeutende Rolle. Gingivafibroblasten entstammen Bindegewebsvorläuferzellen des Zahnsäckchens. Sie bilden Haltefasern, die von der Zementoberfläche zum Alveolarknochen einwachsen (Radlanski, 2011). Sie produzieren Kollagen Typ I, III, V, Kollagenase und Grundsubstanz (Narayanan *et al.*, 1983). Die Regenerationsgeschwindigkeit hängt von der Dichte der Fibroblasten und ihrer Aktivität ab (Schroeder *et al.*, 1973).

Die keratinisierte Gingiva spielt eine bedeutende Rolle für den langfristigen Erfolg und die Verweildauer von Implantaten. So übernimmt die periimplantäre Gingiva vor allem für die

Prävention von Entzündungen eine wichtige Rolle (Eickholz *et al.*, 2012; Schlegel *et al.*, 1994; Listgarten *et al.*, 1991). In einer retrospektiven klinischen Studie wurde festgestellt, dass ein Mangel an keratinisierter bzw. attached Gingiva mit einer stärkeren Plaqueablagerung und einer erhöhten gingivalen Entzündungsreaktion einhergeht (Chung *et al.*, 2006). Daher ist für einen langfristigen Implantaterhalt der dichte Abschluss der Implantate mit keratinisierter Gingiva unabdingbar. Allerdings weist das periimplantäre Bindegewebe weniger Gefäße als das peridentale auf und zeichnet sich dadurch anfälliger gegenüber exogener Kontaminationen aus (Berglundh *et al.*, 1991).

### ***Zelladhäsion auf Oberflächen / Fokalkontakte***

Die Topographie der Oberfläche bestimmt das Adhäsionsverhalten von Zellen und die Ausprägung von Oberflächenrezeptoren. Diese wiederum beeinflussen die Zellreaktionen im Allgemeinen. Das Reaktionsverhalten von Zellen auf bestimmte Oberflächen wurde in vielen Studien untersucht (Zhang *et al.*, 2011; Att *et al.*, 2009; Rompen *et al.*, 2006). Fibroblasten entwickeln auf maschinieren Titanoberflächen eine flache Konfiguration mit Zellkontakten zu benachbarten Zellen sowie ein dichtes Wachstum ohne genaue Orientierung, während sie auf mikrostrukturierten Oberflächen der Topografie entlang und in die Tiefe hinein wachsen (Könönen *et al.*, 1992). Dabei sprießen ihre Mikrofilamente in Rillen und Mikrostrukturen, so dass die Oberflächentopographie Einfluss auf die Orientierung der einzelnen Zelle nimmt (Meyle *et al.*, 1993). Dafür spielen Mikrotubuli, Mikrofilamente und Fokalkontakte eine Rolle (Oakley *et al.*, 1993). Das Adhäsionsverhalten kann gezielt genutzt werden, um durch Mikrostrukturen auf der Implantatoberfläche Zellen an bestimmte Anteile adhären zu lassen (Cochran *et al.*, 1994). So kann beispielsweise Osteoblasten gezielt ein Vorteil gegenüber Epithelzellen an mikrostrukturierten Oberflächen verschafft werden. Dadurch wird es den Osteoblasten ermöglicht, an der Implantatoberfläche in die Tiefe zu wachsen, während darüber eine Anlagerung von Gingivafibroblasten an polierten Anteilen geschieht.

Zellen bilden auf Oberflächen Verbindungszonen aus, an denen sie Kontakt zum Substrat haben. Dies sind spezialisierte Bereiche, die sich an der Zellmembran befinden, sogenannte Fokalkontakte. Der Bereich des Fokalkontaktes auf der Innenseite der Zellmembran steht in Verbindung mit dem Zytoskelett, während die Außenseite Kontakt mit der extrazellulären Matrix hat (Tint *et al.*, 1987). Fokalkontakte bestehen aus verschiedenen Proteinen. Dabei entsteht der Kontakt zu den Proteinen der extrazellulären Matrix durch sogenannte transmembrane Integrine. Sie bilden die zentrale Stelle an der das Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix in Verbindung steht (van der Flier *et al.*, 2001). Vor allem das Fokaladhäsionspro-

tein Vinculin spielt eine wichtige Rolle bei der Bestimmung des Adhäsionsverhaltens von Zellen auf Oberflächen. Es ist ein Bestandteil von Adherens Junctions, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen und besitzt zahlreiche Bindungsstellen für Proteine. Diese stellen eine Verbindung zwischen Aktinfilamenten und der Zellmembran her (Wehner *et al.*, 2013). Vinculin ist ein Hauptstrukturprotein und verbindet das Zytoskelett mit Integrinen. Seine Hauptaufgabe innerhalb der Fokalkontakte ist eher regulierender anstatt struktureller Natur (Critchley, 2000). Vinculin lässt sich durch eine Antikörper-Färbung fluoreszenzmikroskopisch darstellen (Cruz *et al.*, 1997).

### 2.3 *In-vitro*-Modelle für die Bewertung von Implantatoberflächen

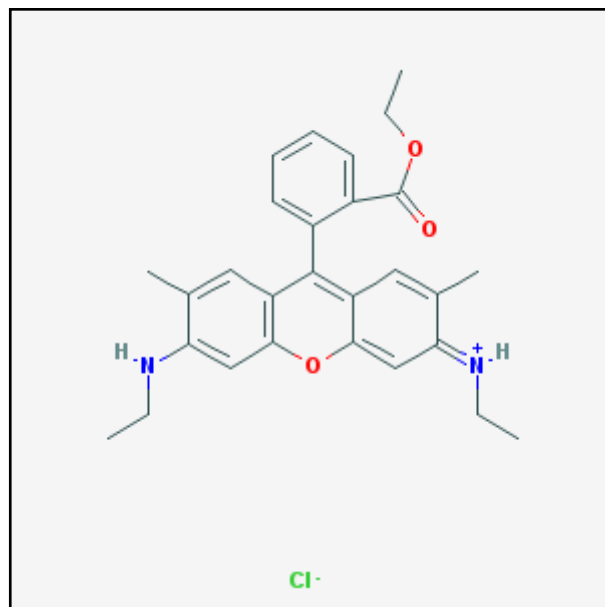
Der Erfolg der Implantattherapie ist abhängig von der Besiedelung der Implantatoberfläche mit Zellen der umliegenden Gewebe. Dabei ist die Interaktion der Implantatoberfläche mit Osteoblasten ebenso wichtig wie der Kontakt des benachbarten Bindegewebes und der Epithelzellschicht mit dem Implantat. Die Abdichtung des Implantates gegenüber der Mundhöhle und ihren Bakterien und Noxen erfolgt durch die dichte Anlagerung der Gingivafibroblasten und Epithelzellen. So wird ein Eindringen von Keimen in die Tiefe und eine dadurch entstehende Entzündung verhindert. Ziel der Einheilung ist das Erreichen eines Halteapparates, der der natürlichen Situation nahekommt und alle Funktionen erfüllt.

Die heutigen technischen Möglichkeiten erlauben es, unterschiedlichste Materialien und Oberflächenbeschaffenheiten herzustellen. So ist man in der Lage, Titan in verschiedenster Weise zu bearbeiten, um eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächenstrukturen zu erhalten. Dabei spielt die Topographie und die Beschaffenheit der Oberfläche eine entscheidende Rolle für das Adhäsionsverhalten von Zellen. Es werden bestimmte Rezeptoren exprimiert, die wiederum Einfluss auf die gesamten Zellreaktionen haben (Brunette *et al.*, 1999). Die Expression dieser Adhäsionsmoleküle durch Zellen ist ein wichtiger Faktor für den Erfolg der Implantattherapie. Daher ist die Untersuchung der Grenzfläche zwischen Implantat und Zellbesiedelung sowie deren Wachstumsverhalten eine wissenschaftlich interessante Darstellung.

#### ***Zellmodell der Untersuchung***

Ziel des in dieser Untersuchung verwendeten Zellmodells war es, das Verhalten von Gingivafibroblasten auf unterschiedlichen Titanoberflächen zu untersuchen. In Anlehnung an Versuchsdurchführungen mit Osteoblasten (Duske *et al.*, 2012) sowie Gingivafibroblasten auf Titanoberflächen (Yamano *et al.*, 2011) wurde ein Modell gestaltet, das das unmittelbare



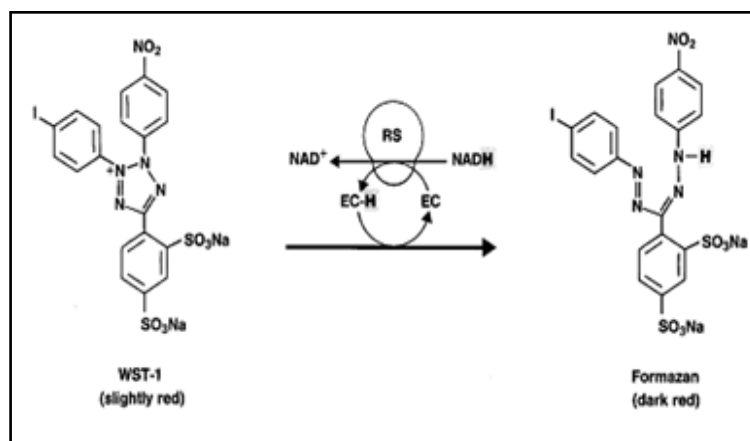


**Abb. 4: Rhodamin 6G, Molekülstruktur.**

Quelle: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=13806>

Die Darstellung des Fokaladhäsionsprotein Vinculin ist eine Färbung zur Bestimmung des Adhäsionsverhaltens von Zellen auf Oberflächen (Geiger *et al.*, 1987). Durch die Anfärbung werden die Fokaladhäsionskontakte grün dargestellt. Der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid eignet sich zum Nachweis von DNA in Zellen. Er bindet in die Furchen doppelsträngiger DNA und entwickelt durch Anregung mit ultraviolettem Licht eine blaue Farbe.

Die Alkalische Phosphatase (ALP) ist ein Plasmaenzym, das die Hydrolyse von Phosphorsäure-Estern katalysiert. Sie wird von Osteoblasten und osteoblastenähnlichen Zellen exprimiert. Der Nachweis der Zellproliferation und -viabilität erfolgte mittels Nachweis einer intakten Atmungskette über das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System durch wasserlösliches Tetrazolium (WST-1, Water soluble Tetrazolium). Hierzu wird die Extinktion des von den Zellen metabolisierten WST-1 gemessen. Dabei wird die Spaltung des Tetrazolium Salz WST-1 (leicht rötlich) durch die mitochondriale Dehydrogenase zu Formazan (dunkelrot) genutzt (Abb. 5). Eine erhöhte Zellproliferation und -viabilität geht einher mit einer vermehrten Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase.



**Abb. 5:** Wirkmechanismus der Succinyldehydrogenase, welches das rote WST-1 Substrat in dunkelrotes Formazan metabolisiert. Entsprechend dem Substratumsatz kann die Proliferation ermittelt werden.

Quelle: Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche, Grenzach-Wyhlen, (D)

## 2.4 Periimplantäre Erkrankungen

Als periimplantäre Erkrankungen werden inflammatorische Entzündungsprozesse an Implantaten bezeichnet. In der Zahnmedizin wird zwischen der periimplantären Mukositis und der Periimplantitis unterschieden. Die periimplantäre Mukositis ist eine entzündliche Reaktion des das Implantat umgebenden Weichgewebes, ohne Knochenverlust. Klinisch lassen sich dabei Plaque und Blutung auf Sondieren erkennen. Die Periimplantitis beinhaltet zusätzlich zur Weichgewebeentzündung eine Knochenresorption. Diese zeichnet sich klinisch durch Taschenbildung  $\geq 4\text{mm}$  und radiologisch durch Knochenverlust um osseointegrierte Implantate aus. Es kann zusätzlich zu Pusaustritt kommen (Zitzmann, 2013; Berglundh *et al.*, 2002; Albrektsson *et al.*, 1994). Die Prävalenz der Periimplantitis beträgt nach einem Zeitraum von 5 bis 10 Jahren *post implantationem* bezogen auf die gesetzten Implantate 10%. Bezogen auf die Patientenzahl beträgt sie 20% (Mombelli *et al.*, 2012). Sie zählt zu den häufigsten Ursachen für Implantatverlust.

Die Periimplantitis ist eine multifaktorielle Erkrankung und zeigt sich in ihrer Ätiologie und klinischen Ausprägung ähnlich einer Parodontitis. Allerdings lassen sich histopathologische Unterschiede zwischen beiden Läsionstypen erkennen (Berglundh *et al.*, 2011). Um eine Periimplantitis zu detektieren, sollten sowohl klinische als auch radiologische Befunde vor Einsetzen des Zahnersatzes auf die Implantate und in der Verlaufskontrolle erhoben werden (Lang *et al.*, 2011).

Für die Entstehung einer Periimplantitis werden unterschiedliche Risikofaktoren diskutiert (Heitz-Mayfield, 2008). Grundsätzlich werden dabei generalisierte Risikofaktoren wie z.B. Parodontitis marginalis, Rauchen und Diabetes mellitus sowie lokale Faktoren wie Weichge-

websdefizite, ungünstige Positionierung des Implantates oder Hygienedefizite als Ursachen benannt (Kaemmerer *et al.*, 2011; Serino *et al.*, 2009; Zitzmann *et al.*, 2008; Karoussis *et al.*, 2004b). Eine genetische Disposition wird diskutiert, es fehlen jedoch umfassende Studien. Schrott *et al.* zeigten 2009 in einer Fünfjahresstudie, dass Patienten mit einer keratinisierten Mukosa von weniger als zwei Millimetern Breite trotz guter Mundhygiene anfälliger für Plaqueakkumulation und Blutung sind.

Die Besiedelung von Implantatoberflächen mit Biofilmen spielt bei der Genese der Periimplantitis die entscheidende Rolle (Mombelli, 2002). Biofilme auf Implantatoberflächen vermindern die Osseointegration und verhindern die Re-Osseointegration von Implantaten nach Exposition gegenüber dem Mundhöhlenmilieu. Sie inhibieren die Besiedelung von Oberflächen mit Osteoblasten und anderen körpereigenen Zellen (Schwarz *et al.*, 2009). Die Faktoren für die Entstehung von Parodontitis und Periimplantitis sind vergleichbar (Heitz-Mayfield *et al.*, 2010). Daher haben Patienten, die an Parodontitis erkrankten, ein erhöhtes Risiko eine Periimplantitis zu entwickeln (Roccuzzo *et al.*, 2012). Die Diagnostik erfolgt über die Messung der Taschen, die Sondierung (Blutung, BOP) und die Beurteilung von Röntgenaufnahmen. Dabei sind die ausschlaggebenden Faktoren für die Diagnosefindung klinische und radiologische Befunde (Zitzmann *et al.*, 2006).

Zusätzliche Faktoren stellen ungünstig positionierte Implantate, mangelhafte Passgenauigkeit der Implantatkonstruktion, parodontalhygienisch unvorteilhaft gestaltete Suprakonstruktionen und nachteiliges Implantatdesign dar (Karoussis *et al.*, 2004a).

### ***Therapie periimplantärer Erkrankungen***

Die Kontrolle der Biofilme und damit subgingivales Debridement, die Dekontamination der Implantatoberfläche und eine effiziente Mundhygiene sind die wichtigsten Therapieoptionen für die Periimplantitis (Todescan *et al.*, 2012). Grundvoraussetzung dabei ist die Etablierung einer guten Mundhygiene und die Reduzierung aller Keimreservoirstellen sowie die Reduktion aller biomechanischen Überbelastungen (Zitzmann *et al.*, 2006). Außerdem ist die Identifikation der individuell wichtigsten Ursachen für die Therapiewahl von Bedeutung.

Basierend auf den Erkenntnissen zu Ätiologie und Pathogenese periimplantärer Erkrankungen wird ein individuelles Monitoring angestrebt. Dieses wird auf den einzelnen Patienten abgestimmt, um eine frühzeitige Diagnose entzündlicher periimplantärer Prozesse zu erreichen. Dabei werden unterschiedliche Parameter erhoben. Dazu zählen die Blutung des periimplantären Gewebes, der Plaquebefall, sondierbare periimplantäre Taschen und eine purulente Exsudation daraus sowie radiologisch der periimplantäre Knochenabbau. Mombelli beschrieb 2003



die „**AKUT**“ Klassifikation. Diese teilt die Schwere der Erkrankung in verschiedene Stufen ein und beschreibt für jede Ausprägung einen individuellen Behandlungsaspekt (Tabelle 2). „**AKUT**“ steht hierbei für **A** = auffangende, **K** = kumulative, **U** = unterstützende und **T** = Therapie.

**Tabelle 2:** Therapiekaskade AKUT nach Mombelli; Auffangende-Kumulative-Unterstützende-Therapie

Sondierungstiefe [mm]	Plaque	Blutung (BOP)	Knochenabbau	AKUT
≤ 3	±	±	-	<b>A</b>
4-5	+	+	-	<b>A + B</b>
≥ 5	+	+	≤ 2mm	<b>A + B + C</b>
	+	+	> 2mm	<b>A + B + C + D</b>
<b>Beweglichkeit / Schmerzen</b>			<b>Klinischer / röntgenologischer Befund</b>	<b>E (Explantation)</b>

Quelle: Farbatlanten der Zahnmedizin; Bd. 1, Parodontologie; S. 514; Hrsg. K. H. Rateitschak; Thieme Verlag, Stuttgart, New York; 2004

Als Standardtherapie werden die initiale nicht invasive Therapie, die regenerative Therapie sowie die invasive, resektive parodontale Therapie angewandt (Zitzmann *et al.*, 2006; Gernet *et al.*, 2007). Dabei wird eine Taschenreduktion bzw. eine Tascheneliminierung angestrebt. Dies wird durch Dekontamination der Implantatoberfläche und durch Entfernung des Entzündungsgewebes erreicht. Dafür stehen verschiedene Behandlungsansätze zur Verfügung, die je nach Fortschritt der Erkrankung eskaliert werden. Das „**AKUT**-Protokoll“ **A** (Mukositis und Sondierungstiefen bis 3 mm) umfasst die mechanische Implantatreinigung, die eine Glättung und Politur der Oberfläche vorsieht. Für die Reinigung stehen Gumminapf und Paste sowie Metall-, Teflon-, Kunststoff-, oder Keramikküretten zur Verfügung. Zusätzlich gibt es ultraschallaktivierte Küretten, die mit antimikrobiellen Spülungen kombiniert werden können. Eine Alternative bietet das Debridement mittels feinkörniger Pulverstrahlreinigung oder die Laserdekontamination (Gonçalves *et al.*, 2010; Gosau *et al.*, 2010; Schwarz *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2005; Augthun *et al.*, 1998; Rühling *et al.*, 1994). Die Maßnahme **A+B** greift bei purulenter Exsudation, 4-5 mm tiefen Taschen und ersten Anzeichen periimplantärer Gewebedestruktion. Sie beinhaltet zusätzlich die Taschenspülung mit 0,2% Chlorhexidindigluconat sowie die weitere Anwendung der CHX 0,2% Spülung oder Spray durch den Patienten. Die Steigerung der Behandlung zu dem Paket **A+B+C**, bei Sondierungstiefen größer 5 mm und radiologisch erkennbarem Knochenabbau, erfolgt durch die Anwendung einer unterstüt-

zenden kalkulierten antibiotischen Therapie gegen anaerobe Keime (systemisch Metronidazol 1 g für 10 Tage oder lokal „controlled released drugs“, z.B.: Atridox) (Schwarz *et al.*, 2009; Rateitschak *et al.*, 2004; Luterbacher *et al.*, 2000; Mombelli *et al.*, 1992). Tritt ein deutlicher Knochenverlust ein, wird das Behandlungspaket um den Faktor **D** (chirurgisch-korrektiv) erweitert. Dies erfolgt nach vorhergehendem Antibiotikaeinsatz (Paquette *et al.*, 2008). Dabei wird nach chirurgischer Freilegung die Dekontamination der Implantatoberfläche durch Säure, mechanischem Abtragen oder Bearbeitung mittels abrasiver Pulver erreicht. Der chirurgische Eingriff kann sowohl resektiv als auch regenerativ-augmentativ erfolgen. Es erfolgt die Auffüllung des Knochendefekts um eine Re-Osseointegration zu erreichen (Roos-Jansåker, 2007; Baron *et al.*, 2000; Wetzel *et al.*, 1999; von Arx *et al.*, 1997). Bei Beweglichkeit des Implantates aufgrund fehlender Osseointegration erfolgt als Therapie Maßnahme **E**, die Explantation. Dies sollte rasch geschehen um weiteren entzündlichen Knochenverlust zu vermeiden.

Die Eliminierung des Entzündungsgewebes und die Dekontamination der Implantatoberfläche führt zu einem Sistieren der Periimplantitis. Sie führt jedoch nicht zu einer Reduktion des Knochendefektes. Daher kann die Wiederherstellung des Knochens nach einer erfolgreichen Initialtherapie durch regenerative Maßnahmen angezeigt sein. Dazu eignen sich rekonstruktive Verfahren, die eine Versorgung von Defekten mittels autologem Knochen oder mit Knochenersatzmaterial sowie die membrangestützte Knochenregeneration umfassen (Gernet *et al.*, 2007; Neukam *et al.*, 2007; Zitzmann *et al.*, 2006).

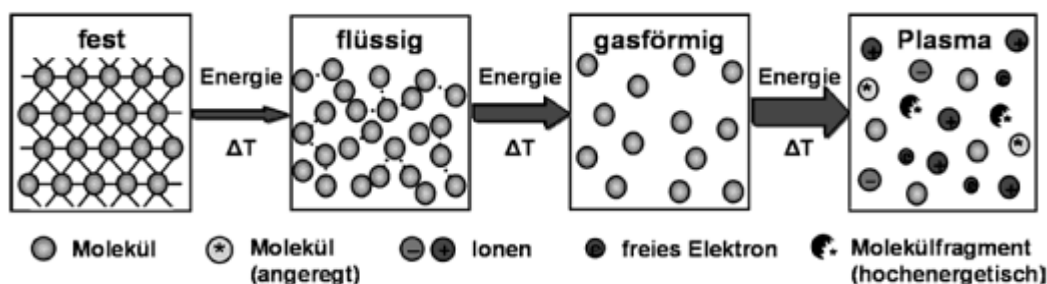
Die mikrostrukturierte Oberfläche der Implantate stellt für die Entfernung des Biofilms eine besondere Herausforderung dar. Die mechanische Bearbeitung der Titanoberfläche kann zu einer Zerstörung und Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit führen, ohne dass dabei eine vollständige Biofilmentfernung erfolgt. Bei der Laserbehandlung besteht die Gefahr der Überhitzung und damit der Schädigung des Nachbargewebes (Geminiani *et al.*, 2012; Geminiani *et al.*, 2011). Eine rein chemisch desinfizierende Spülung erreicht keine vollständige Dekontamination, es verbleiben häufig morphologisch intakte Biofilme auf der Oberfläche (Ntrouka *et al.*, 2011; Gosau *et al.*, 2010). Zurzeit kann nicht eindeutig festgelegt werden, welches die erfolgversprechendste Therapie der Periimplantitis ist. Jedoch konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass die lokale antibiotische Therapie in Kombination mit einem Debridement eine Stagnation der Periimplantitis bewirkt (Esposito *et al.*, 2012). Eine Methode, die die mikrostrukturierte Oberfläche bei vollständiger Eliminierung des Biofilms

erhält, ist nur eingeschränkt für die klinische Anwendung im subgingivalen Bereich nutzbar (Sahm *et al.*, 2011).

Inzwischen ist die Anwendung von kaltem atmosphärischem Plasma zur Desinfektion und Dekontamination von Oberflächen als Alternative vorgeschlagen worden (Rupf *et al.*, 2012; Rupf *et al.*, 2011). Diese eignet sich für die Beseitigung von adhärennten Mikroorganismen auf Titanoberflächen (Idlibi *et al.*, 2013; Koban *et al.*, 2011; Rupf *et al.*, 2010b). Die Fähigkeit, mittels Plasmen Spalten und Hohlräume zu reinigen, erlaubt auch die Reinigung von mikrostrukturierten Implantatoberflächen.

## 2.5 Physikalisches Plasma

Plasma (griechisch *πλάσμα plásma*, ‚Gebilde‘) stellt neben „flüssig“, „fest“ und „gasförmig“ den vierten Aggregatzustand in der Physik dar (Wintermantel *et al.*, 2009; Melamies, 2009) (Abb. 6).



**Abb. 6:** Die vier Aggregatzustände der Materie. Die Energiezufuhr bewirkt eine Änderung des Aggregatzustandes von fest über flüssig zu gasförmig und schließlich zu Plasma. Dabei ist das Gas angeregt, ionisiert und fragmentiert.

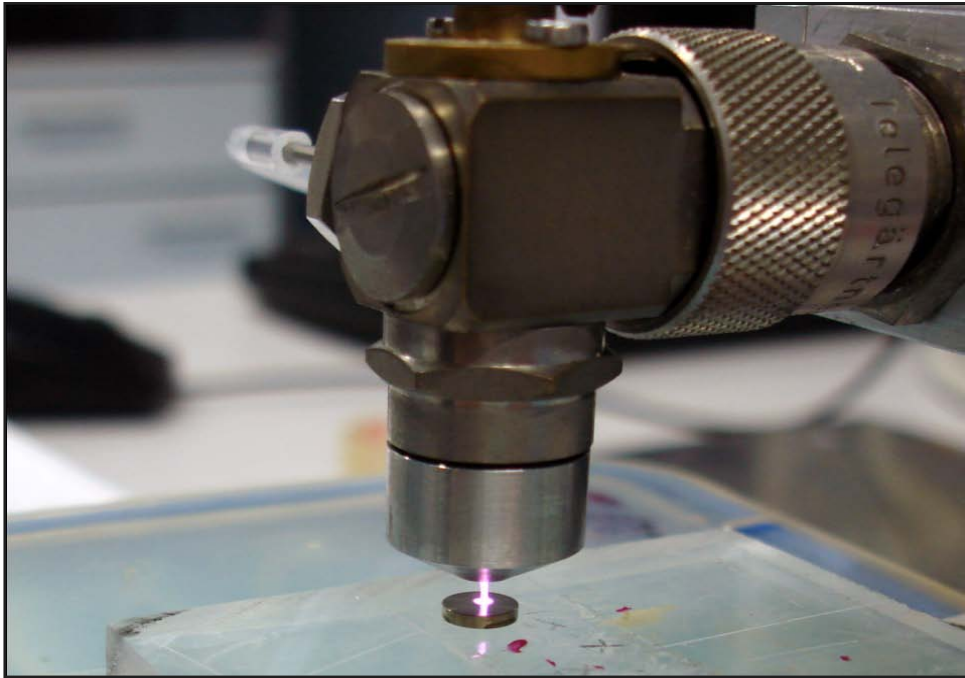
Quelle: Fraunhofer IFAM, Bremen

Der amerikanische Physiker Irving Langmuir arbeitete als erster Wissenschaftler mit Plasma und prägte den Namen der ionisierten Gase (Langmuir *et al.*, 1926). Unter physikalischen Plasmen versteht man ionisierte Gasströme, die aus freien Ladungsträgern wie Elektronen, Ionen, freien Radikalen und geladenen Molekülen bestehen. Diese sind elektrisch leitfähig und emittieren bei kleinsten Energiedichten sichtbares Licht. Dabei wird entsprechend der enthaltenen Atome oder Moleküle ein spezifisches Licht emittiert. Die Plasmaeigenschaften werden durch die geladenen Plasmateilchen, ihre elektromagnetische Wechselwirkung untereinander und die Wechselwirkung mit äußeren Feldern bestimmt. Plasmen kommen unter anderem als terrestrisches (Blitze), künstliches (Plasmalampe) und astrophysikalisches Plasma (Fixsterne) vor. Plasma kann anhand der Temperaturentwicklung in thermisches (warmes)

und nicht-thermisches (kaltes) Plasma unterteilt werden. Eine weitere Unterteilung ist die Einteilung in Hochdruck-, Normaldruck- und Niederdruckplasma. Die Plasmatechnik wird in unterschiedlichen Bereichen erfolgreich eingesetzt. Anwendung findet diese in der Lichttechnik (Gasentladungslampen), in der Oberflächentechnik zur Beschichtung, der Oberflächenmodifizierung, der Abtragung, der Reinigung, der Aufrauhung, der Oberflächenhärtung und der Oxidation (von Ardenne *et al.*, 2005). Weitere Anwendungsgebiete sind die Analysetechnik, die Werkstoffverarbeitung und die Plasmamedizin. In der Medizin wird Plasma vor allem für die Desinfektion und Reinigung von Materialien (Plasmadesinfektion) (Masaoka, 2007; Deng *et al.*, 2007) und zur Trennung von Gewebe (Coblation) oder zur Stillung von intraoperativen Blutungen (Argon-Plasma-Koagulation) (Manner, 2008) genutzt. Besonders diskutiert wird die Bearbeitung dentaler Implantate zur Verbesserung der Osseointegration mittels Plasma (Zhu *et al.*, 2009). Dabei werden mittels heißer Plasmen bioreaktive Oberflächen geschaffen (Rizzi *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2001).

Inzwischen ist es möglich, Plasmaquellen zu miniaturisieren wie z.B. der „kINPen“ (neoplas tools GmbH, Greifswald, D) und somit für eine zukünftige klinische Anwendung einzusetzen (Koban *et al.*, 2011; Rupf *et al.*, 2011; Coulombe *et al.*, 2006). Als kaltes atmosphärisches Plasma wird Plasma bezeichnet, welches am Strahlenauftrittspunkt biologisch unbedenkliche Temperaturen aufweist. Durch eine gepulste Anregung können adäquate Temperaturen von unter 40 °C erzeugt werden. Da der Plasmastrahl nur wenige Mikrosekunden gezündet wird, kann er durch den ungezündeten Gasstrom gekühlt werden. Diese kalten atmosphärischen Plasmen ermöglichen die Reinigung und Desinfektion biologischer und technischer Oberflächen. So konnte in einer Studie nachgewiesen werden, dass ein Niedertemperatur-Argon-Plasma chronisch infizierte Wunden desinfiziert und die Wundheilung fördert (Isbary *et al.*, 2011). Dabei muss besonders hervorgehoben werden, dass Plasmen auch in Spalten sowie Hohlräume eindringen können, um diese zu reinigen. Plasma ist ein wirksames Agens um Biofilme zu desintegrieren und zu desinfizieren (Koban *et al.*, 2011; Rupf *et al.*, 2011; Rupf *et al.*, 2010b; Joshi *et al.*, 2010; Sladek *et al.*, 2007).

Ionisierte lokale Gasströme, sogenannte Plasmajets, ermöglichen es, Flächen ohne Kontakt zu bearbeiten (Abb. 7). Dabei sind die im Plasma entstehenden reaktiven Spezies ausschlaggebend für die Wirkung des Plasmas (Nosenko *et al.*, 2009).

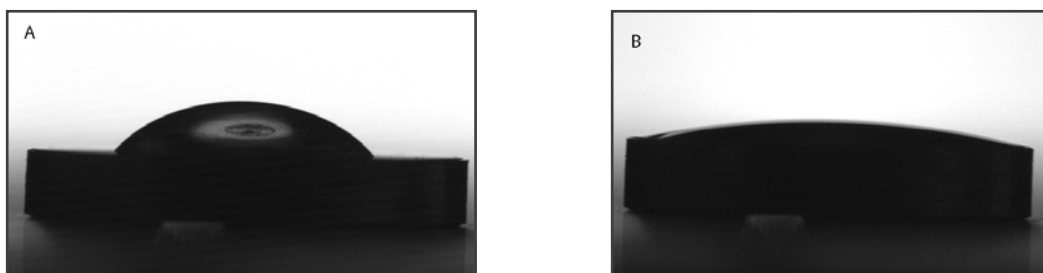


**Abb. 7:** Bestrahlung einer Titanprobe mittels Plasmajet.

Quelle: C. Mayer

Untersuchungen zeigen, dass sich kaltes atmosphärisches Plasma für die Desintegration sowie die Beseitigung von Biofilmen auf Titanoberflächen eignet (Rupf *et al.*, 2011; Wind *et al.*, 2009; Sladek *et al.*, 2007). Zusätzlich zeigen Versuche, dass sich die Oberflächenbenetzbarkeit von Titanoberflächen nach einer Behandlung mit kaltem atmosphärischem Plasma erhöht (Lehmann *et al.*, 2013).

Es kommt zu einer starken Verringerung des Kontaktwinkels, den ein Wassertropfen auf der Titanoberfläche bildet (Abb. 8).



**Abb. 8:** a) Benetzungsverhalten eines Wassertropfens auf Titan; b) Benetzungsverhalten eines Wassertropfens auf Titan nach Plasmabehandlung (30 s, 2 W).

Quelle: A. Lehmann, Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung e. V., Leipzig

### ***Plasma in der Implantologie***

Man kennt viele Anwendungen und Nutzungsmöglichkeiten für Plasmen in der Material-, Oberflächen- und Lichttechnik. So werden Plasmen beispielsweise im Rahmen der Plasmaste-

rilisation verwendet. Dabei werden die Faktoren Hitze, UV-Strahlen, geladene Partikel und die freien Radikalen ( $O_3$ ,  $O_2$ ,  $O$ ,  $OH$ ,  $NO$ ,  $NO_2$ ) genutzt (Laroussi, 2005). Im Bereich der dentalen Technik werden Plasmen bisher vor allem für die Bearbeitung von Titanoberflächen bei Implantaten benutzt. Dabei wird eine kontrollierte Oxidierung durch Plasmaoxidation erzeugt. Dies geschieht in einem Vakuumbehälter unter Spannung und unter atmosphärischen Druckverhältnissen (0,1 bis 1 mmHg) (Hugger *et al.*, 2006).

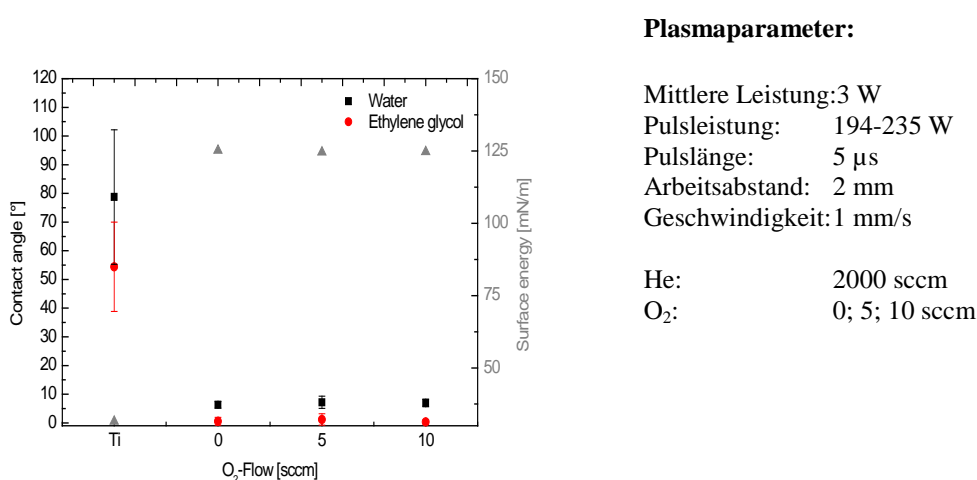
Für den therapeutischen Anwendungsbereich liegen Plasmen in unterschiedlichen Geräteformen vor. Es gibt den Plasma-Pen („kINPen MED“, Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. INP Greifswald mit der Charité Berlin und dem Universitätsklinikum Greifswald) für die Behandlung und Reinigung sowie Desinfektion von Wunden (Isbary *et al.*, 2011; Isbary *et al.*, 2010; Lademann *et al.*, 2009; Laroussi *et al.*, 2008; Walsh *et al.*, 2006; Laroussi *et al.*, 2006). Es werden Plasmajets (Kolb *et al.*, 2008) in Form von „Nadeln“ (Stoffels *et al.*, 2002) und „Bürsten“ (Yu *et al.*, 2007) beschrieben.

In der Zahnmedizin wurden experimentelle Untersuchungen im Bereich der Oberflächenmodifizierung und der antimikrobiellen Wirkung auf Biofilme mit kaltem Atmosphärendruckplasma mit verschiedenen Zielsetzungen durchgeführt (Jablonowski *et al.*, 2013b). Anwendung finden Plasmen bei der Inaktivierung kariogener Bakterien (e.g. *S. mutans*) in Kavitäten (Joaquin *et al.*, 2009; Sladek *et al.*, 2007) und der Verbesserung des Haftverbundes zwischen Komposit und Zahn (Ritts *et al.*, 2010), dem Bleichen von Zähnen (Park *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009a), sowie der Reinigung von Wurzelkanälen (Jablonowski *et al.*, 2013a; Pan *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2009). Erste Studien befassen sich mit der Besiedelung von Osteoblasten auf plasmabearbeiteten Titanoberflächen (Duske *et al.*, 2012). Weiterhin werden Plasmen für die Dekontamination und Desinfektion von Geräten genutzt (Ehlbeck *et al.*, 2011).

### ***Grundlagenuntersuchungen der Arbeitsgruppe***

Die Arbeitsgruppe mit Teilnehmern des Leibniz-Institutes für Oberflächenmodifizierung (IOM) e.V. Leipzig, des Fraunhofer-Institutes für Zelltherapie und Immunologie (IZI) Leipzig und des Universitätsklinikums des Saarlandes, Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, untersuchte im Rahmen von Grundlagenuntersuchungen den therapeutischen Einsatz atmosphärischen Plasmas im Bereich der Zahnmedizin. So wurden *In-vitro*-Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkweise des Plasmas auf Biofilme und zur Modifikation des Haftverbundes zwischen Zahn und Füllungswerkstoffen durchgeführt (Idlibi *et al.*, 2013; Rupf *et al.*, 2010a; Wind *et al.*, 2009). Der Einfluss von Plasma auf die Oberflächen von Titanprüfkörpern und das Kulturverhalten von Gingivafibroblasten sowie Osteoblasten

wurde durch die Arbeitsgruppe Rupf, Lange und Mayer (alle Universität des Saarlandes) eruiert. Als Substrat wurden Titanprüfkörper mit mikrostrukturierter und maschinierter Oberflächenkonfiguration gewählt. Dies ist von Bedeutung, da sich Gingivafibroblasten in ihrer Rolle des Schutzgewebes während der Einheilung von Implantaten an maschinieren sowie an rauen Implantatanteilen etablieren sollen. Untersuchungen zu der Oberflächenbenetzbarkeit ergaben, dass sich der Kontaktwinkel der bestrahlten Titanprüfkörper deutlich reduzierte (Abb. 9). So stieg die Oberflächenbenetzbarkeit im Vergleich zu unbestrahlten Proben signifikant an. Zusätzlich erkannte man Unterschiede zwischen den beiden Oberflächenbeschaffenheiten. Die geätzten Oberflächen zeigten primär eine geringere Hydrophilie als die maschinieren Titanoberflächen.



**Abb. 9: Kontaktwinkelmessung im Rahmen von Vorversuchen.**

Quelle: A. Lehmann, Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung e. V., Leipzig (Lehmann et al., 2013)

In Versuchen der Arbeitsgruppe wurden unterschiedliche Gasmischungen, Leistungsstärken, Flächendosis, Kultivierungszeiträume und Vorbehandlung der Titanoberflächen überprüft. Insgesamt wurden 500 Titanscheiben mit maschinierter (maTi) oder mikrostrukturierter Oberfläche (SLA) (Titan Grade 2, Firma Friadent, Mannheim, D) verwendet. 380 der Prüfkörper wurden wiederholt in Vorversuchen der Arbeitsgruppe zur Ermittlung geeigneter Versuchsbedingungen eingesetzt.

Es wurde geprüft, ob die Reaktivgaszusammensetzung einen Einfluss auf die Fibroblastenkultur hatte. So wurden unterschiedliche Zusammensetzungen analysiert und als Optimum zwei Gasmischungen herausgearbeitet, bei denen als Trägergas Helium sowie als Reaktivgase Sauerstoff und Stickstoff zum Einsatz kamen. Die alleinige Verwendung von Helium sowie höhere Konzentrationen der Reaktivgase Sauerstoff und Stickstoff führten zwar ebenfalls zur Verbesserung der Benetzbarkeit und damit zu einer homogenen Besiedlung, jedoch war die

Zellanzahl nach den unterschiedlichen Kulturzeiten nicht erhöht. Wachstumshemmung konnte nach Plasmabestrahlung in keinem Falle beobachtet werden. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Auswirkung verschiedener Kultivierungszeiten analysiert. So wurden Zeiten von 4, 12, 24, 48 und 120 Stunden sowie 6, 7 und 14 Tagen untersucht. Es zeigten sich günstige Zeiträume von 4, 12 und 24 Stunden. Längere Kultivierung führte zur Ablösung der mehrlagig auf den Prüfkörpern aufgewachsenen Zellen. Ein weiterer Untersuchungsaspekt war der Einfluss verschiedener Medien auf die bestrahlten Oberflächen. So wurden die Titanplatten nach Bestrahlung einmalig und mehrmalig mit Gelatine, PBS oder Kulturmedium behandelt. Zusätzlich wurden Einflüsse von Pulsleistung (zwischen 250 und 300 Watt), Pulslänge (zwischen 3-5  $\mu$ s) sowie Geschwindigkeit der Bewegung des Plasmajets über die Titanoberfläche (5-16 mm/s) geprüft. Eine Pulsleistung von 300 Watt, Pulslänge von 5  $\mu$ s und Geschwindigkeit von 8 mm/s wurden hinsichtlich Stabilität des Plasmajets und akzeptabler Behandlungsdauer als sinnvolle Parameterkombination herausgearbeitet. Weitere Versuche wurden zur Prüfung der Temperaturentwicklung am Auftreffpunkt des Plasmastrahls auf der Titanoberfläche durchgeführt. Diese erhöhte sich kurzfristig und erreichte ihr Maximum im Zentrum des Plasmajets innerhalb von 2-3 Sekunden. Sie sank unmittelbar nach der Bestrahlung. Bei der hier gewählten Leistungsstufe von 5 W wurden Temperaturen von 47 °C erreicht, dabei jedoch in einem Abstand von 2 mm zu dem Auftreffpunkt nicht mehr als 43 °C. Ergänzende Untersuchungen befassten sich mit verschiedenen Färbemethoden. Dabei zeigten sich befriedigende Ergebnisse für die Fluoreszenzfärbung mittels Phalloidin, DAPI und Vinculin. Zusätzlich wurde die Auswertung mittels Rasterelektronenmikroskop durch verschiedene Fixierungsprotokolle geprüft.

## 2.6 Ziel der Arbeit

Die *In-vitro*-Kultivierung von primären humanen Gingivafibroblasten auf Implantatoberflächen nach Plasmabestrahlung ist Thema dieser Arbeit. Dafür wurde ihr Verhalten über einen Zeitraum von 4, 12 und 24 Stunden beobachtet und mit nicht plasmabehandelten Proben verglichen.

Es galt folgende Null-Hypothesen zu untersuchen und zu prüfen:

- Die Bestrahlung von Titanoberflächen hat keinen Einfluss auf das initiale Attachment und die frühe Bedeckung von Gingivafibroblasten auf Titanoberflächen.



- Durch die Bestrahlung von Titanoberflächen resultieren für Gingivafibroblasten keine morphologischen Unterschiede in Bezug auf die Zellmorphologie und die Struktur des Zytoskeletts.
- Die Bestrahlung von Titanoberflächen zeigt keinen Einfluss auf die Zellproliferation und -viabilität.

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

##### *Gingivafibroblasten*

Es wurden primäre humane Gingivafibroblasten verwendet. Diese wurden im Rahmen der operativen Entfernung von dritten Molaren in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg gewonnen. Die Entnahme der Zellen wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (Nr. E168/09). Alle Patienten, von denen Gingivafibroblasten isoliert wurden, waren in einem guten gesundheitlichen Zustand. Um sowohl Epithelien als auch parodontale Gewebe auszuschließen, wurde das mittlere Drittel der entnommenen Bindegewebsschicht verwendet. Das Gewebe wurde in PBS Lösung (Phosphat gepufferte Salzlösung, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) gelagert, unmittelbar in Petrischalen (94 mm, Greiner bio-one, Frickenhausen, D) überführt und mit einem Deckglas abgedeckt. Es wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, PAA, Velizy-Villacoublay, F), dem 10% fetales Kälberserum (FBS, Biochrom AG, Berlin, D) zugegeben wurde, zugefügt. Zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen und Pilzinfektionen wurde 100 Units/ml Penicillin (Biochrom), 100 µg/ml Streptomycin Sulfate (Biochrom) und 2,5 µg/ml Amphotericin B (Biochrom) dem Medium hinzugegeben. Die Zellkultur wurde in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde bis zum Auswachsen der Zellen auf dem Boden des Kulturgefäßes unter dem Deckglas zwei Mal wöchentlich gewechselt. Nach mikroskopischer Beurteilung des Phänotyps wurden die Zellen wie im Folgenden beschrieben kultiviert.

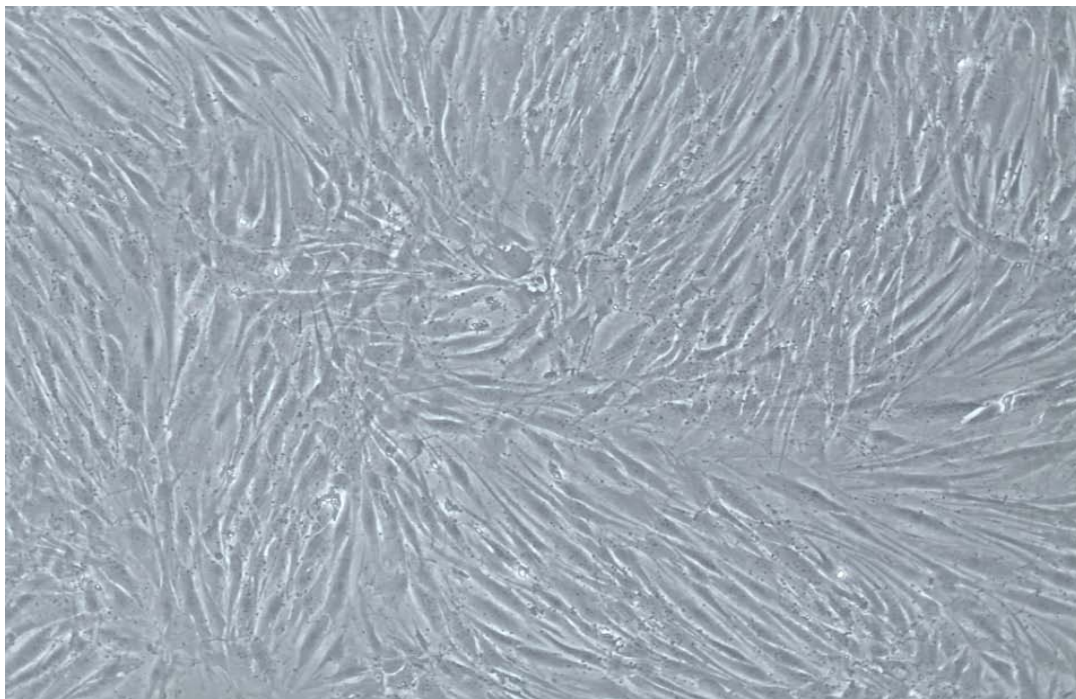
### ***In-vitro-Kultivierung***

#### ***Zellkultur***

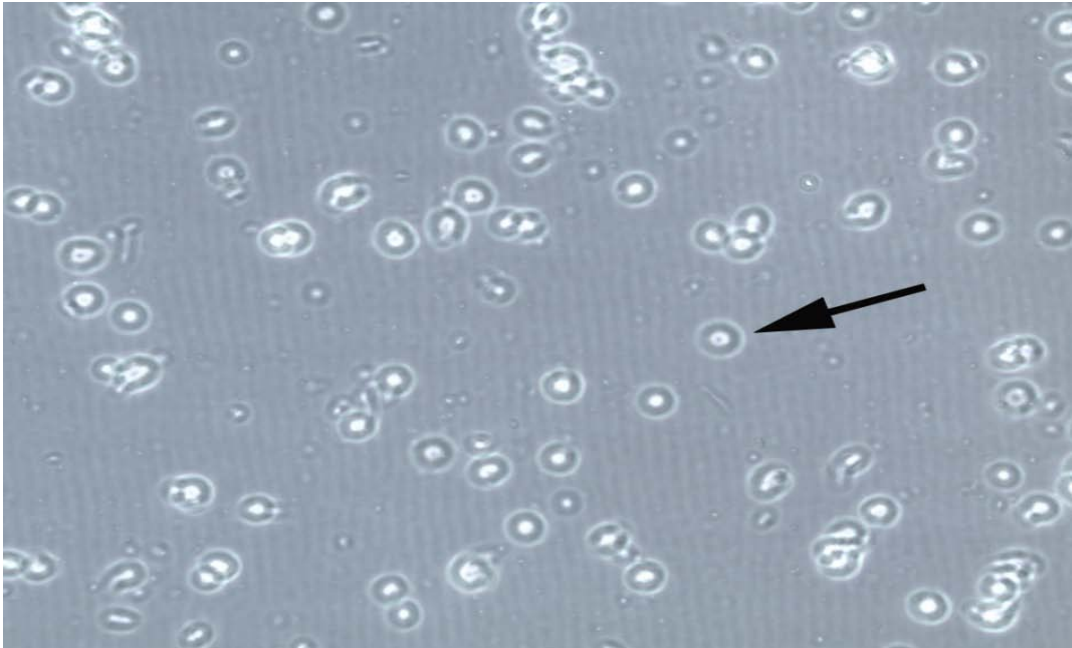
Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>3</sup>, Greiner bio-one) unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Nährmedium wurde DMEM-Flüssigmedium mit 10% fetalem Kälberserum genutzt. Das Medium wurde zwei Mal wöchentlich gewechselt. Die Kultivierung erfolgte jeweils bis zur Konfluenz der Zellen.

#### ***Passage der Zellen***

Nach Erreichen der Konfluenz (Abb. 10) erfolgten die Passage der Zellen sowie die Teilung der Kultur auf zwei neue Zellkulturflaschen. Dazu wurde das Medium entfernt und der Zellteppich in der Kulturflasche mit Hilfe einer Trypsin Lösung (0,25% Trypsin, 0,1% EDTA in PBS, Biochrom) abgelöst (Abb. 11). Die Kontrolle der Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche erfolgte über ein Mikroskop (Leica Mikroskop DMIL, LEICA Microsystems Framework, Wetzlar, D). Die Trypsin Lösung wurde nach einigen Minuten entfernt und die Reaktion mit frischem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde sieben Minuten bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in DMEM-Flüssigmedium resuspendiert und in zwei neue Zellkulturflaschen ausgebracht.



**Abb. 10:** Mikroskopische Beurteilung konfluierender Gingivafibroblasten in einer Zellkulturflasche (Leica Mikroskop). Es lässt sich ein einlagiger, geschlossener Zellrasen erkennen.



**Abb. 11:** Mit Trypsin-EDTA abgelöste Gingivafibroblasten. Die Zellkörper weisen eine charakteristische runde Zellkonfiguration auf (Pfeil).

### ***Aufbewahrung der Zellen***

Um die Zellen über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin-EDTA-Lösung (0,25% Trypsin, 0,1% EDTA) aus der Kulturflasche abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Daraufhin wurden sie für sieben Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Dem Pellet wurde eisgekühltes DMEM/FBS-Flüssigmedium zugegeben. Unter permanentem Schütteln erfolgte die tröpfchenweise Zugabe von DMEM-Flüssigmedium mit 20% DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt, D). Die Zellsuspension wurde daraufhin in mehrere vorgekühlte Kryoröhrchen (Greiner bio-one) überführt und zügig in das Tiefkühlfach (-20 °C) gebracht. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt und dort gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch Zugabe des 10fachen Volumens kalten DMEM/FBS-Flüssigmediums. Die Zellen wurden daraufhin bei 4 °C und 400 x g sieben Minuten lang zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit Hilfe von frischem Medium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt. Die Lagerung erfolgte ab diesem Zeitpunkt im Brutschrank (Hera Cell 240, Thermo Scientific, Waltham, USA) bei 37 °C und unter 5% CO<sub>2</sub>.

### ***Behandlung der Zellen bei Kontamination***

Zu Beginn der Zellkultur, nach Isolation der Gingivafibroblasten, wurde dem Nährmedium Antibiotikum in Form einer Penicillin/Streptomycin Lösung (Verdünnung 1:100) zugegeben. Somit wurde eine bakterielle Kontamination der Zellen und des Brutschrankes verhindert. Bei

einer bakteriellen Kontamination der Zellen während der Kultur wurden diese wiederholt mit DMEM-Flüssigmedium gewaschen und mit einer Penicillin/Streptomycin Lösung (Verdünnung 1:100) im Nährmedium mehrere Tage lang behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen aus dem Brutschrank entfernt, dieser gereinigt und autoklaviert.

Während der Versuchsdurchführung wurde darauf verzichtet, im Rahmen der Zellkultivierung prophylaktisch Antibiotika dem Medium zuzusetzen, um die Reaktionsfähigkeit der Zellen zu sichern und die Kulturbedingungen konstant zu halten.

### 3.2 Versuchsaufbau

#### *Prüfkörper*

Es wurden 120 Titanscheiben mit maschinierter (maTi) oder mikrostrukturerter Oberfläche (SLA) (Titan Grade 2, Firma Friadent, Mannheim, D) verwendet. Dabei kamen zwei Titanscheibengrößen zum Einsatz. Für die Versuchsreihe 1 wurden Titanplatten mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Höhe von 2 mm gewählt. Die Versuchsreihe 2 wurde mit Titanplatten eines Durchmessers von 10 mm und einer Höhe von 2 mm durchgeführt. Die Hälfte der Prüfkörper (n = 60 Stück) war maschinert (maTi), die andere Hälfte (n = 60 Stück) war sandgestrahlt und geätzt (SLA, Rauheit von 2 µm, mittlerer Maximalwert der Profiltiefe von 21,35 µm). Es wurden 36 Titanscheiben als unbehandelte Kontrollen mitgeführt. Davon waren n = 18 maschinert (maTi) und n = 18 sandgestrahlt und geätzt (SLA) (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendete Probenanzahl von Titanprüfkörpern**

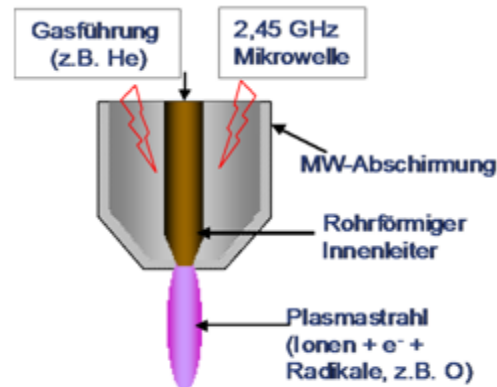
Versuchsreihe	Proben SLA (n = 42)	Proben maTi (n = 42)	Kontrolle SLA (n = 18)	Kontrolle maTi (n = 18)
1 (Fluoreszenz / ALP)	n = 24	n = 24	n = 12	n = 12
2 (REM / WST)	n = 18	n = 18	n = 6	n = 6

Vor der Nutzung wurden die Titanproben in einer 70%igen Ethanollösung 15 Minuten im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend folgte eine Spülung in Natriumhypochlorid und eine Spülung in destilliertem Wasser. Zuletzt wurden sie kurz vor Bestrahlung in *Aqua dest.* autoklaviert.

#### *Plasmaquelle*

Bei der verwendeten Plasmaquelle handelt es sich um einen kalten physikalischen Plasmajet. Dabei gelingt es unter Normalbedingungen (Normaldruck und Raumtemperatur) einen ionisierten Gasstrom herzustellen. Dies geschieht mittels gepulster Mikrowelle, Hochfrequenz oder Wechselstrom-Hochspannung und unter Verwendung von Edelgasen (Helium, Neon und

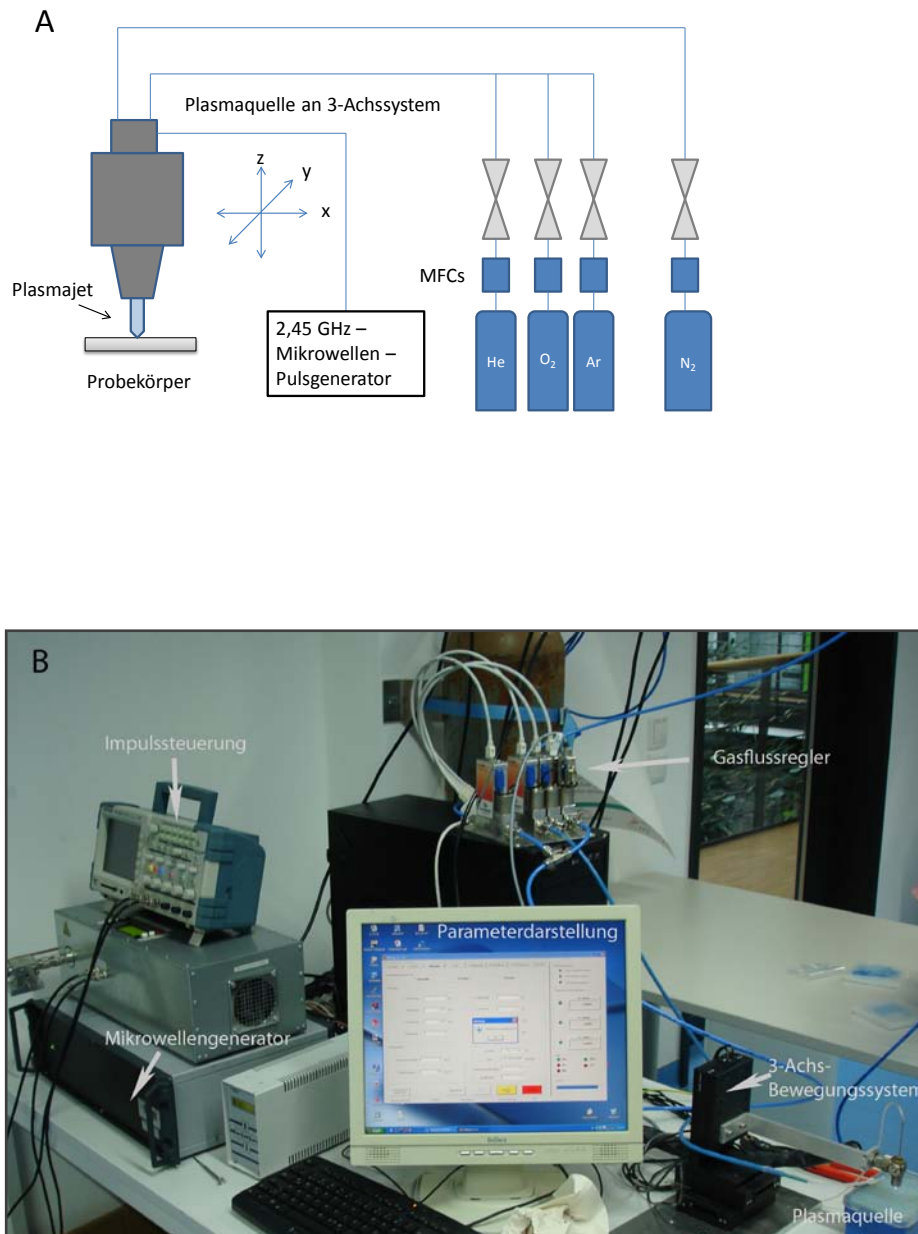
Argon) als Trägergase. Der ionisierte Gasstrom besteht aus Ionen, Elektronen, Neutralteilchen und im Plasma erzeugten Radikalen (Abb. 12). Diese reaktiven Sauerstoffspezies (Stickstoffmonoxid (NO), atomarer Sauerstoff (O) und Hydroxid (OH) Radikale) können durch Beimischung chemisch aktiver Gase (z. B. Sauerstoff, Stickstoff) erzeugt werden oder sie entstehen spontan durch Eindiffundieren von Umgebungsluft in das Plasma.



**Abb. 12:** Schematische Darstellung einer Plasmaquelle und des Plasmajets. Durch die Plasmaquelle strömt Gas, welches mittels gepulster Mikrowelle (2,45 GHz) angeregt wird. Der Plasmastrahl besteht aus Ionen, Elektronen, Neutralteilchen und im Plasma erzeugten Radikalen. Zusätzlich wird Licht emittiert.

*Quelle: PD Dr. A. Schindler, Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung e. V., Leipzig*

Die verwendete Plasmaquelle erzeugte durch Anregung eines Gasstroms mittels gepulster Mikrowelle (2,45 GHz) einen Plasmajet. Die Regulierung des Plasmajets war durch zugeführte Pulsenergie, Pulszeit und resultierend mittlerer Mikrowellenenergie möglich. Die Plasmaquelle wurde auf einem computergesteuerten 3-Achsen Bewegungssystem (Steinmeyer MC-G047, Feinmess Dresden GmbH, Dresden, D) montiert (Abb. 13). So waren reproduzierbare Einstellungen von Zeit-, Distanz- und Scanparametern möglich.



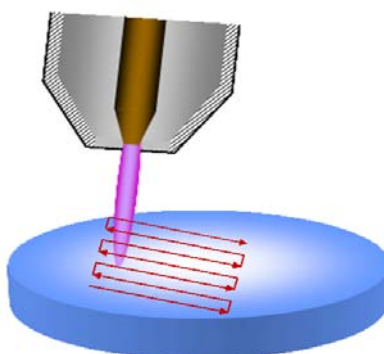
**Abb. 13:** a) Schematische Darstellung des Aufbaus der Plasmaquelle; b) Übersicht über Anteile und Aufbau der Versuchsanordnung.

Quelle: a) PD Dr. A. Schindler, A. Lehmann, Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung e.V., Leipzig; b) C. Mayer

### **Bearbeitungsparameter**

Die Behandlung der Titanprobekörper fand in einem klimatisierten S2 Labor unter konstanten Umgebungsbedingungen (Zulufttemperatur:  $22 \pm 2$  °C, 8facher Luftwechsel pro Stunde, leichter Überdruck) statt. Der Arbeitsabstand zwischen der Plasmaquelle und Titanprobenoberfläche betrug 2 mm. Die Pulsdauer betrug 5  $\mu$ s bei einer Pulsleistung von 300 W (Tektronix TPS2024 Oscilloscop, Beaverton, OR, USA) ausgehend von einer Mikrowelleneingangs-

leistung von 5 W. Die Geschwindigkeit der Plasmaquelle in Richtung der y-Achse betrug 8 mm/s. Die Bewegung in Richtung der x-Achse erfolgte durch mäanderförmige Linienscans (Abb. 14). Der Gasfluss bestand aus zwei unterschiedlichen Gasmischungen (Massenflussregler, Bronkhorst, Ruurlo, NL). Eine Hälfte der Proben wurde mit 2000 sccm Helium und 5 sccm Sauerstoff bestrahlt. Die andere Hälfte wurde mit einer Gasmischung von 2000 sccm Helium, 250 sccm Stickstoff und 10 sccm Sauerstoff behandelt (Tabelle 4). Jeweils unbehandelte Kontrollen wurden mitgeführt. Diese wurden ohne Plasmazündung nur mit den Prozessgasen bestrahlt.



**Abb. 14:** Schematische Darstellung des mäanderförmigen Verlaufs des Plasmastrahls.

Quelle: PD Dr. A. Schindler, A. Lehmann, Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung e.V., Leipzig

**Tabelle 4:** Probenprotokoll, Plasmaquelle mit P-MWGG09

Proben-nummer	Arbeits-abstand (mm)	Mittlere Leistung (W)	Peakleistung (W)	Pulslänge (µs)	v (mm/s)	He (Sccm)	O <sub>2</sub> (Sccm)	N <sub>2</sub> (Sccm)
X	2	5	300	5	8	2000	5	
X	2	5	300	5	8	2000	10	250

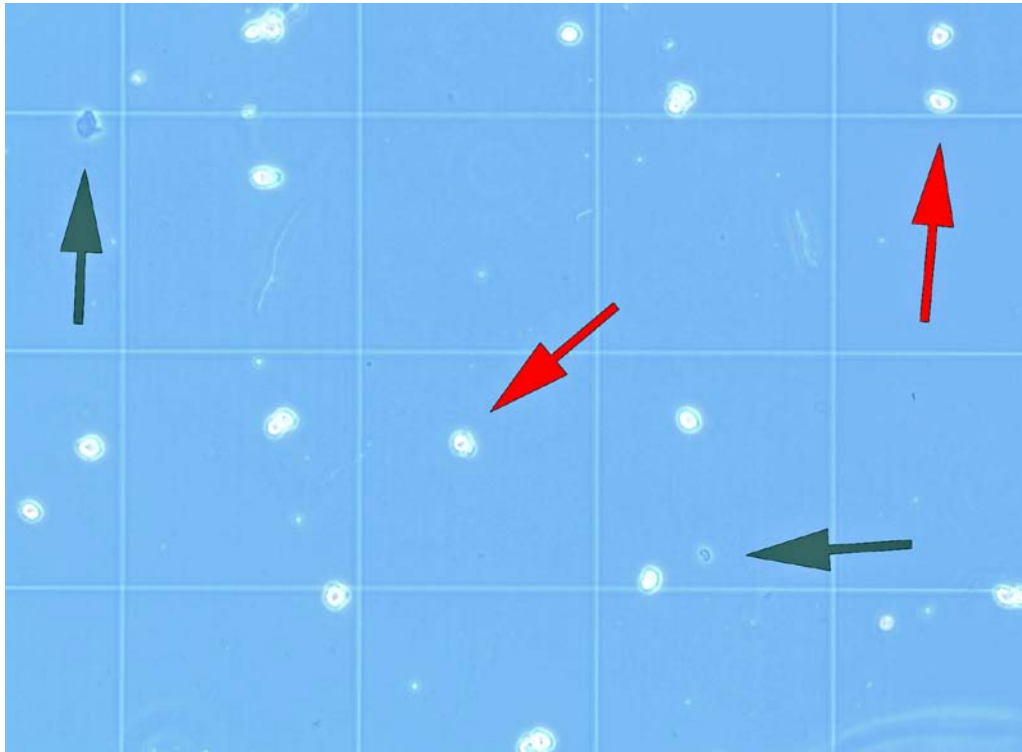
### **Applikation der Zellen auf die Prüfkörper**

Bei allen Versuchen erfolgte die Applikation der Zellen nach Bestrahlung der Titanproben durch die Plasmaquelle unter sterilen Bedingungen. Es wurden Gingivafibroblasten, die sich in der sechsten Passage befanden, genutzt.

Zunächst wurde das Kulturmedium aus der Zellkulturflasche der gewünschten Zellen abgesaugt. Es folgte eine Spülung mit warmen PBS. Daraufhin wurden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,25% Trypsin, 0,1% EDTA in PBS) überspült und für fünf Minuten im Brutschrank inkubiert, womit das Ablösen der Zellen beschleunigt wurde. Um einen Stopp der Reaktion zu erreichen und damit auftretende Zellschäden zu vermeiden, wurde der Zell-



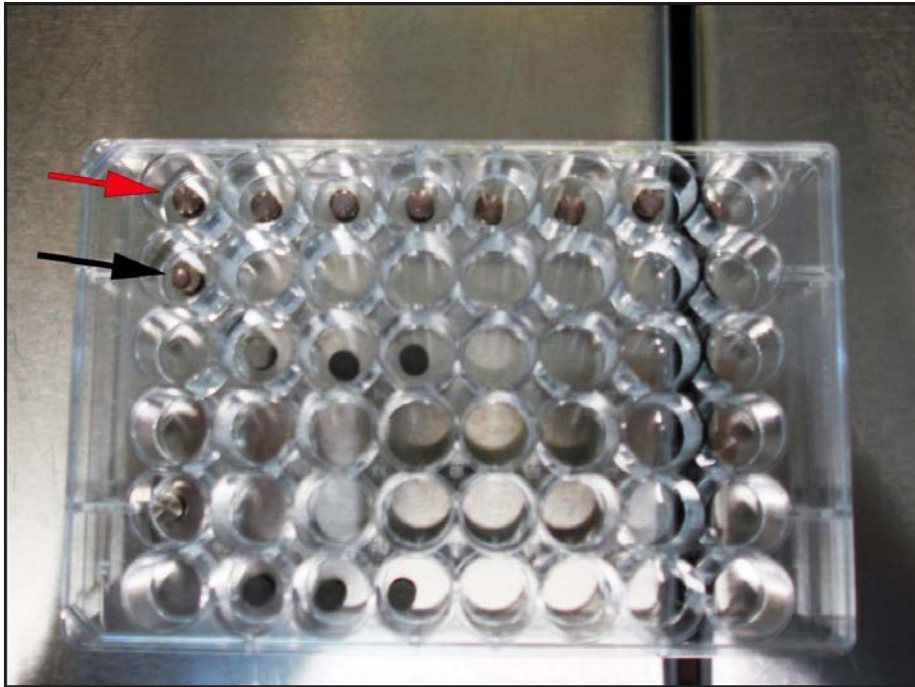
kulturflasche die doppelte Menge frisches Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen (Greiner bio-one) überführt, für sieben Minuten bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in Medium resuspendiert und es wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda Königshofen, D) die Zellzahl bestimmt (Abb. 15). Dadurch konnte das erforderliche Volumen errechnet werden, um die gewünschte Zellanzahl ( $10^4$  Zellen) zu erhalten.



**Abb. 15:** Fotografie der Zellen in der Neubauer-Zählkammer im Mikroskop. Die roten Pfeile zeigen gesunde, helle Zellen, die zur Zählung herangezogen werden. Die grauen Pfeile zeigen tote, blaufärbte Zellkörper. Diese werden nicht mit berechnet.

Die Zellen wurden direkt nach Bestrahlung der Probekörper auf diese aufgebracht. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension vorsichtig in Bewegung gehalten wurde, um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden. So erfolgte vor Entnahme der gewünschten Zellmenge eine unter größter Vorsicht durchgeführte Resuspension, um ein Absinken der Zellen auf den Grund des Aufbewahrungsgefäßes (BD, Franklin Lakes, USA) zu verhindern. So wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf das entnommene Volumen erreicht. Die Applikation der Zellsuspension auf die bestrahlten Probekörper und die unbestrahlten Kontrollen erfolgte unter einer Sicherheitswerkbank (Hera Safe KSP 12, Thermo Scientific) (Abb. 16). 30 Minuten nach der Applikation der Zellsuspension auf die Titanplättchen wurde jede Kavität mit 200 µl DMEM-Flüssigmedium, dem 10% FBS zugesetzt war, aufgefüllt. Die Titanplättchen mit den aufgebrachten Zellen wurden anschließend wie beschrieben für 4, 12 oder 24 Stunden kultiviert.





**Abb. 16:** 48-Wellplatte mit bestrahlten und unbestrahlten Titanplatten. Die ersten Proben mit applizierter Zellsuspension. Es ist ein Unterschied in der Benetzung zu erkennen. Die bestrahlten Proben zeigen eine gleichmäßige Verteilung der Zellsuspension auf der Oberfläche (roter Pfeil), während sich auf den unbestrahlten Proben lokal am Applikationsort ein Tropfen findet (schwarzer Pfeil).

*Quelle: C. Mayer*

### ***Kultivierung***

Die Kultivierung erfolgt über 4, 12, 24 Stunden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator. Während der Kultivierung wurde kein zusätzliches DMEM-Flüssigmedium zugegeben.

### **3.3 Auswertung**

Für die Auswertung des Zellattachments wurden sowohl Fluoreszenzbilder als auch raster-elektronenmikroskopische Bilder herangezogen. Im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie wurde die Vinculin Färbung als Hauptmethode genutzt. Unterstützend wurden die rasterelektronenmikroskopischen Bilder bewertet. Zellbiologische Tests (ALP/WST-1) ergänzten die Untersuchungen.

### ***Zellattachement, -verteilung und -morphologie***

Für die Analyse des Zellattachements, der Zellverteilung und der Zellmorphologie wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Göttingen, D) mit einer Quecksilber-Kurzbogen-Reflektor-Lampe (Kompaktlichtquelle HXP 120, Leistungselektronik JENA, Jena, D) genutzt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer Digitalkamera (Axio Cam MRc5, Carl Zeiss). Als Bildbearbeitungssoftware wurde das Programm AxioVision (Carl Zeiss) ge-

nutzt. Die Färbung der Proben erfolgte mit einer Phalloidin- (*Amanita phalloides* (P2141), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D), Vinculin- (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und DAPI-Färbung (4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid, Roche, Grenzach-Wyhlen, D).

#### ***Fluoreszenzmikroskopie: Vinculin-, Phalloidin- und DAPI-Färbung***

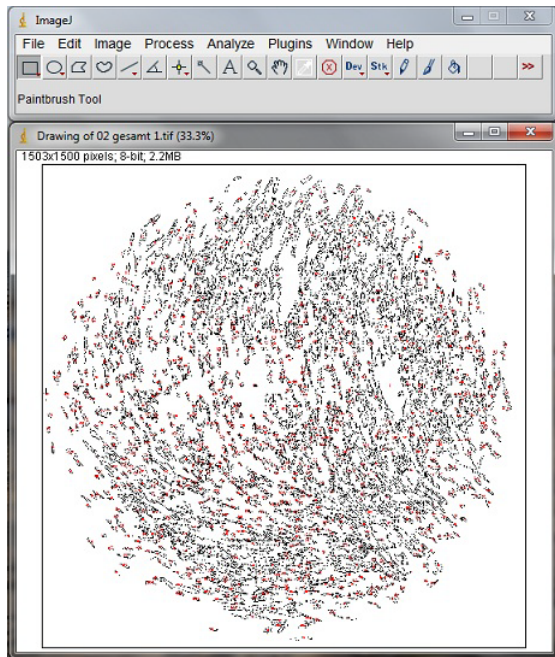
Für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte die Fixierung der Zellen auf den Prüfkörpern mit Hilfe von 2,5% Glutaraldehyd (in PBS gelöst, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) für 30 Minuten. Zur Entfernung des Glutaraldehyds wurden die Prüfkörper fünf Mal mit PBS gespült. Es folgte die Permeabilisierung der Zellwand mit 0,1% Triton-X (Octylphenol-poly(ethylenglycolether)<sub>x</sub>; Roche) in PBS. Danach wurden die Proben zweifach mit PBS gewaschen. Die Reduktion von unspezifischem Hintergrund erfolgte mittels 1% BSA (Bovines Serum Albumin in PBS, Gibco; Invitrogen, Carlsbad, USA). Anschließend wurden die Proben für zwei Stunden in einer feuchten Kammer mit einem primären Antikörper gegen Vinculin (Monoklonaler Anti-Vinculin, Antikörper aus Mäusen; Sigma-Aldrich Chemie GmbH), der in 5% BSA gelöst wurde, inkubiert. Es erfolgte ein zweifacher Waschschrift mit 0,1% Tween 20 (Poly(oxyethylen)<sub>x</sub>-Sorbitan-Monolaurat; Roche) in PBS, gefolgt von einer Entfernung des Tween 20 mit PBS. Danach schloss sich die Inkubation mit einem sekundären Antikörper (Anti Mouse IgG, RD Systems, Minneapolis, USA) für eine Stunde in einer feuchten Kammer an, gefolgt von erneutem zweifachem Waschen in 0,1% Tween 20 (in PBS) und einer einfachen Waschung mittels PBS. Als nächstes wurde eine Phalloidin Stammlösung (1 mg/ml MetOH) hergestellt. Diese wurde mit PBS verdünnt, auf die Proben aufgebracht, 25 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und wie beschrieben gewaschen. Zuletzt erfolgte die Applikation der DAPI-Lösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Die Titanscheiben wurden auf Objektträger (Super Frost; Menzel-Gläser, Braunschweig, D) aufgebracht und unter einem Auflichtfluoreszenzmikroskop (Axio Scope A1) ausgewertet. Es wurden Aufnahmen mit Objektiven der Vergrößerung 2,5x, 10x und 20x gefertigt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image J (1.43u für Microsoft Windows, Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA). Die Ergebnisse wurden in einer Excel Datei (Microsoft Office, Microsoft Corporation, Redmond, USA) gespeichert. Prüfkörper, auf denen sich keine Zellen befanden, wurden nicht berücksichtigt.

Die Aufnahmen mit einer Vergrößerung von 25 (2,5 (Objektiv) x 10 (Okular)) wurden für die Erstellung einer Gesamtübersicht jeder Probe genutzt. Es wurde jeweils ein Bild pro Quadrant

aufgenommen. So ergaben sich vier Bilder, die mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Adobe Photoshop CS5 (64bit, Adobe Systems GmbH, München, D) mit der Ebenentechnik zu einem Bild zusammengefügt wurden. Dadurch konnten die Übersichtsbilder zur Auswertung der prozentualen Zellbedeckung herangezogen werden. Es wurden die Umrisse der Zellkörper auf der Titanoberfläche dargestellt und die Bedeckung dieser mit Image J ausgewertet (Abb. 17).



**Abb. 17:** Die Zellbedeckung einer bestrahlten Titanprobe mittels Image J dargestellt und nachfolgend errechnet.

Weitere Aufnahmen wurden mit 100facher Vergrößerung (10 (Objektiv) x 10 (Okular)) angefertigt, jeweils aus der Mitte der Probe und aus dem Randbereich. Diese wurden zur Auswertung der Zellanzahl, des Attachmentverhaltens und der durchschnittlichen Zellkerngröße genutzt. Für die Berechnung der Zellanzahl wurde die Aufnahme aus der Bildmitte herangezogen. Diese spiegelte eine Fläche von 0,600227 mm<sup>2</sup> (Breite 0,89562 mm; Höhe 0,67018 mm; in Relation zum Vergrößerungsfaktor des Bildes (Längenmaß 50 µm)). Um die Zellanzahl in diesem Abschnitt des Titanprobekörpers zu bestimmen, wurde die Anzahl der Zellkerne mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms gezählt. Das Ergebnis wurde anschließend auf die gesamte Probekörperoberfläche (19,63495 mm<sup>2</sup>) hochgerechnet. Für die Beurteilung des Attachmentverhaltens wurden die Aufnahmen aus der Bildmitte und dem Randbereich herangezogen. Im Bildbearbeitungsprogramm wurde jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt (Seitenlänge 10 cm) gewählt. In diesem wurden die Anhaftungsstellen der Fibroblasten prozentual mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms bestimmt. Die Berechnung der Zellkerngröße er-

folgte ebenfalls über den repräsentativen Bildausschnitt (Seitenlänge 10 cm). In diesem Quadrat wurde nun die Anzahl der Zellkerne sowie der prozentuale Anteil der Zellkernbedeckung auf diesem Plattenabschnitt bestimmt und so die durchschnittliche Zellkerngröße berechnet. Da die Zellen unregelmäßig geformt waren, war die Bestimmung der Zellgröße anhand der Längenbestimmung bzw. des Durchmessers nicht sinnvoll. Um die durchschnittliche Zellgröße zu bestimmen, wurde die Bedeckung der Probenoberfläche durch die Anzahl der Zellen dividiert.

### ***Rasterelektronenmikroskopie (REM)***

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte am Anatomischen Institut der Universität des Saarlandes, Homburg. Sie wurde mit einem FEI XL 30 ESEM FEG Rasterelektronenmikroskop (Fei, Eindhoven, NL) durchgeführt. Insgesamt wurden 36 bestrahlte Titanscheiben und 16 unbestrahlte Kontrollen untersucht. Um die Proben zu fixieren, wurden diese nach der Kultivierung mit 2,5% Glutaraldehyd für 30 Minuten fixiert. Danach wurden sie zur Entfernung des Glutaraldehyd fünf Mal für zehn Minuten mit PBS gespült und anschließend mit 4% Osmiumsäure (Osmiumtetroxid, Carl Roth GmbH) für 20 Minuten das zweite Mal fixiert. Es folgten fünf weitere Spülungen von je zehn Minuten mit PBS und die Dehydration mit einer aufsteigenden Alkoholreihe für je zehn Minuten (25%, 50%, 70%, 90%, 96%, 96% Ethanol). Danach wurden die Proben mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS, Merck AG) getrocknet (Bray *et al.*, 1993). Das HMDS wurde ein zweites Mal aufgebracht und unter einem Abzug verdampft. Die vorbereiteten Proben wurden mit Hilfe einer doppelseitigen Klebefolie (Plano, Wetzlar, D) auf REM Probesteller (Plano) aufgebracht. Es folgte eine Beschichtung der Proben mit einer 2-3 nm dicken Platinschicht (Sputter Coater SC 7640 mit planetarischer Probenbühne, Quorum Technologies Ltd., Newhaven, GB).

Jede Probe wurde anschließend im Rasterelektronenmikroskop in drei Vergrößerungsstufen (Übersichtsaufnahme 25-, 500-, 1000fach) untersucht, um die Bedeckung der Proben zu bestimmen. Repräsentativ wurden einzelne höhere und geringere Vergrößerungen (200- bis 8000fach) für die bildliche Darstellung der Zellen genutzt. Es wurden die unterschiedlichen Oberflächen und dabei die bestrahlten und unbestrahlten Platten miteinander verglichen. Für die Auswertung der Zellbedeckung auf den Probekörpern wurde die Übersichtsaufnahme herangezogen. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung diente der Überprüfung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse und ermöglichte Aussagen zur phänotypischen Ausbildung der Fibroblastenzellkörper.

## ***Biologische Aktivität***

### ***Alkalische Phosphatase Aktivität (ALP)***

Für die kolorimetrische Bestimmung der alkalischen Phosphatase Aktivität wurde ein Kit genutzt (Biovision, Mountain View, Kalifornien, USA). Dieses Kit nutzt *p*-Nitrophenylphosphat, welches nach Dephosphorylierung durch die alkalische Phosphatase bei einer Wellenlänge von 405 nm eine gelbe Färbung annimmt. Der Inhalt des Kits besteht aus mehreren Komponenten (ALP Assay Buffer, pNPP Tablette, ALP Enzym, stopp Solution). Zunächst wurden die Lösungen laut Anleitung hergestellt. Dazu wurden zwei pNPP Tabletten auf 5,4 ml Assay Buffer gelöst, um eine 5 mM Arbeitslösung zu erhalten. Diese ist für 12 Stunden bei 4 °C stabil. Zusätzlich wurde die ALP Enzymlösung hergestellt, indem die Stammlösung mit 1 ml Assay Buffer gemischt wurde. Diese Lösung ist bei 4 °C für zwei Monate haltbar.

Für die Durchführung der ALP Bestimmung wurden jeder Kavität der Kulturplatten, die Titanscheiben enthielten, 80 µl Medium entnommen und in eine 96-Wellplatte (Greiner bio-one) überführt. Dazu wurden 50 µl pNPP Solution gemischt und die Platte für 60 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur stehen gelassen. Gleichzeitig wurde ein sogenannter Color sample (Blank) hergestellt, indem 80 µl Medium und 20 µl Stopp Solution gemischt wurden. Als Standard wurden 40 µl 5 mM pNPP Solution in 160 µl Assay Buffer verwendet. Es wurde eine Reihe aufsteigender Konzentrationen für die Standardkurve angelegt. Dazu wurden 0, 4, 8, 12, 16 und 20 µl Standard in die Wellplatte gegeben und jeweils mit Assay Buffer auf 120 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 10 µl ALP Enzyme hinzugegeben und 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Alle Experimente wurden doppelt durchgeführt. Nach einer Stunde wurde die Reaktion mit Hilfe von 20 µl Stop Solution unterbrochen und die Extinktion im ELISA Reader (Tecan Infinite 200, Magellan V6.6, Tecan, Grödig, A) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

### ***Zell Proliferation Kit WST-1 (Water soluble Tetrazolium)***

Das Reagenz WST-1 (Roche) ist eine gebrauchsfertige Lösung zum Nachweis der Zellproliferation und -viabilität. Das Reagenz enthält das Tetrazolium Salz WST-1 und ein Elektronen bindendes Reagenz. Diese sind in steriler Phosphat gepufferten Salzlösung (PBS) gelöst.

Nach der Kultivierungszeit von 4, 12 und 24 Stunden wurden 20 µl WST-1 Reagenz zu jeder Kavität der Kulturplatten hinzugefügt in denen sich jeweils eine bestrahlte bzw. unbestrahlte Titanplatte mit den kultivierten Fibroblasten und 200 µl Kulturmedium befanden. Zusätzlich wurde eine Kontrollkavität, die reines Medium ohne WST-1 Reagenz enthielt, mitgeführt und

ein Leerwert mit WST-1 Reagenz vorbereitet. Nach zwei Stunden Inkubation unter oben genannten Kulturbedingungen wurde die Wellplatte für eine Minute gut geschüttelt und anschließend die Lichtabsorption im ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen. Die Referenz wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

### ***Statistische Auswertung***

Es wurden insgesamt 72 Proben mittels Plasmaquelle behandelt und untersucht sowie 48 Proben ohne Zündung der Trägergase als Kontrollgruppe mitgeführt. Alle Untersuchungen erfolgten 4fach. Für jeden untersuchten Parameter wurde der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) bestimmt. Die Ergebnisse der bestrahlten Proben wurden mit den Ergebnissen der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Für die statistische Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

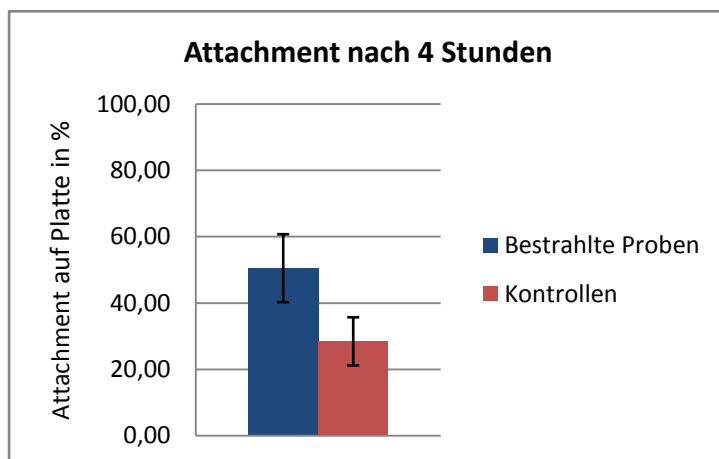
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellattachment, Zellverteilung

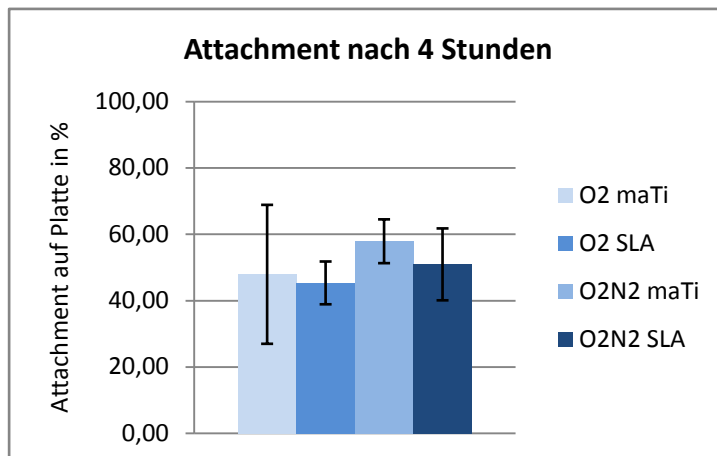
#### *Kultivierung 4 Stunden*

##### **Fluoreszenzmikroskopie / fokale Adhäsion (Vinculin)**

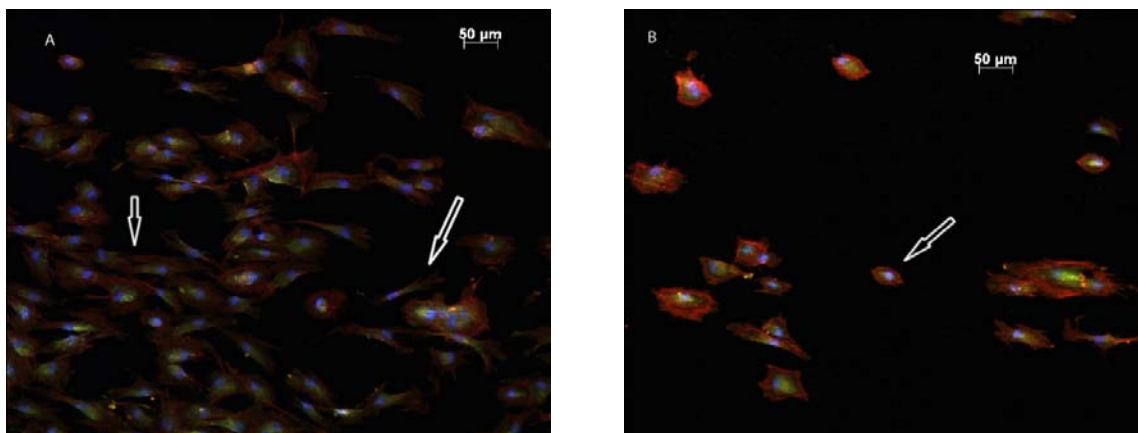
Es zeigten sich signifikante ( $p = 0,001$ ) Unterschiede zwischen den bestrahlten Proben und den mitgeführten Kontrollen. Die bestrahlten Proben wiesen größere Attachmentflächen der Zellen auf als die ohne Zündung der Trägergase behandelten Kontrollen (Abb. 18, 20). Bei Betrachtung der beiden Gaszusammensetzungen ( $O_2N_2$ : 2000 sccm Helium, 250 sccm Stickstoff, 10 sccm Sauerstoff;  $O_2$ : 2000 sccm Helium, 5 sccm Sauerstoff) gegeneinander konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 19,  $p = 0,115$ ). Auch das Attachmentverhalten in Abhängigkeit von der Oberflächenstruktur der Titanprüfkörper zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 19,  $p = 0,176$ ).



**Abb. 18:** Relativer Anteil fokaler Kontaktflächen (Vinculin) nach 4 Stunden Kultivierung. Mittelwerte und Standardabweichung im Vergleich Plasmabestrahlung zu unbehandelten Kontrollen.



**Abb. 19:** Relativer Anteil fokaler Kontaktflächen (Vinculin) nach 4 Stunden Kultivierung. Vergleich der bestrahlten Proben in Abhängigkeit von Reaktivgaszusammensetzungen und Oberflächenbeschaffenheiten: Mittelwerte und Standardabweichung.



**Abb. 20:** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten auf maschinerten Titanoberflächen nach 4 Stunden Kultivierung (Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung).

**A:** Bestrahlte Probe (Gasmischung:  $O_2/N_2$ ). Pfeile: längliche Phänotypen, flächiges Attachment der einzelnen Zellen (grüne Färbung, Vinculin).

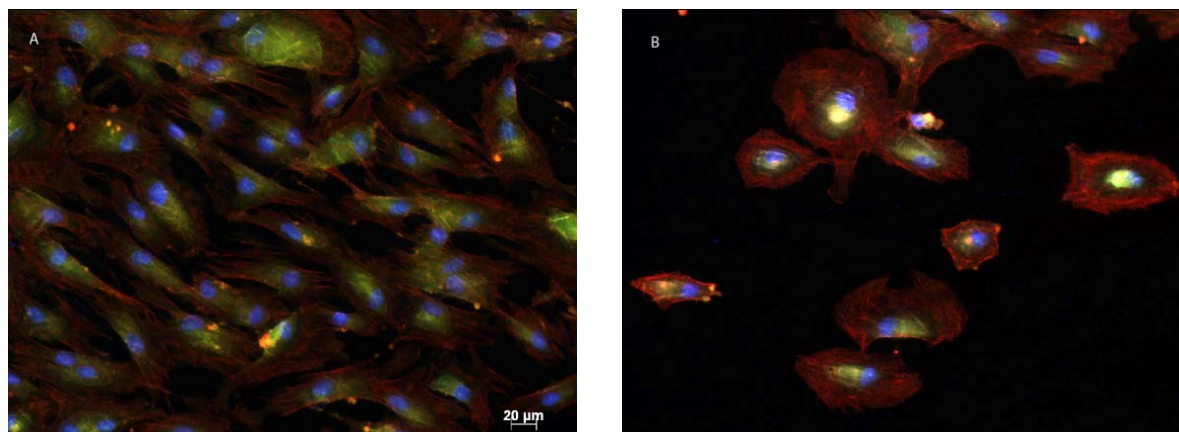
**B:** Mitgeführte Kontrolle, Gasstrom ohne Plasmazündung. Pfeil: rundliche Zellkörper, punktuell Adhäsionsverhalten (grün).

### Fluoreszenzmikroskopie / Zellgröße

Die Untersuchung der Zellgröße nach 4 Stunden ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den bestrahlten Proben hinsichtlich der Gasmischung (maTi  $O_2$  vs. maTi  $O_2/N_2$ :  $p = 0,343$ ; SLA  $O_2$  vs. SLA  $O_2/N_2$ :  $p = 0,886$ ). Auf bestrahlten maschinerten Oberflächen bedeckten die Zellen eine größere Fläche als auf bestrahlten mikrostrukturierten Oberflächen ( $p = 0,002$ ). Im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen waren sowohl für maschinerte als auch für mikrostrukturierte Oberflächen keine Unterschiede der Zellgröße nachzuweisen (maTi be-



strahlt vs. maTi unbestrahlt:  $p = 0,630$ ; SLA bestrahlt vs. SLA unbestrahlt:  $p = 0,461$ ). Im Mittel wiesen die bestrahlten Proben sowie die unbestrahlten Kontrollen gleich große Zellkörper auf (Mittelwert bestrahlte Proben:  $3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ ; Mittelwert unbestrahlte Kontrollen:  $3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ ) (Abb. 21, Tabelle 5).



**Abb. 21:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 4 Stunden Kultivierung: Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung, Gasparameter:  $\text{O}_2$ .

**A:** Maschinerte, bestrahlte Titanprobe, mit großen, länglichen Gingivafibroblasten.

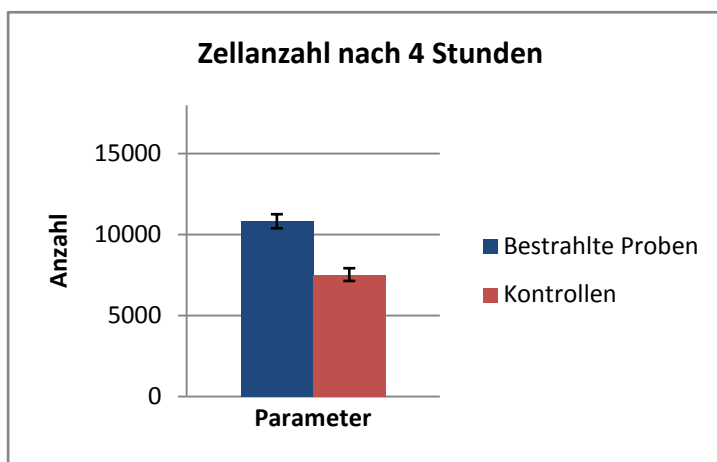
**B:** Mitgeführte Kontrolle mit rundlichen, kleineren Zellen. Die Zellkörper zeigen auf beiden Präparaten vergleichbare Größen.

**Tabelle 5:** Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichung der Zellgröße nach 4 Stunden

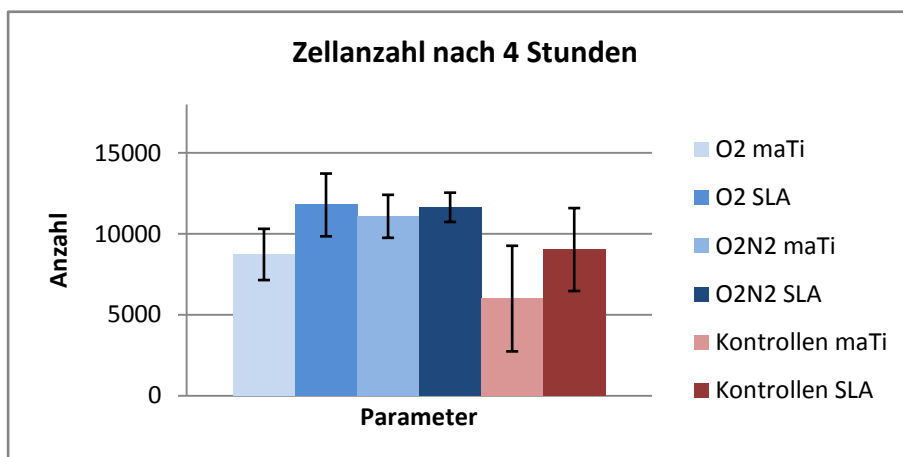
<b>Zellgröße, 4 Stunden</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
Bestrahlte Proben	$3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
Kontrollen	$3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$2 \times 10^{-4}$
maTi	$5 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$2 \times 10^{-4}$
SLA	$2 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
$\text{O}_2$ maTi	$5 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$2 \times 10^{-4}$
$\text{O}_2$ SLA	$3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$2 \times 10^{-4}$
$\text{O}_2\text{N}_2$ maTi	$4 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
$\text{O}_2\text{N}_2$ SLA	$2 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$4 \times 10^{-5}$
Kontrollen maTi	$4 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$4 \times 10^{-4}$
Kontrollen SLA	$1 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$

### Fluoreszenzmikroskopie / Zellanzahl

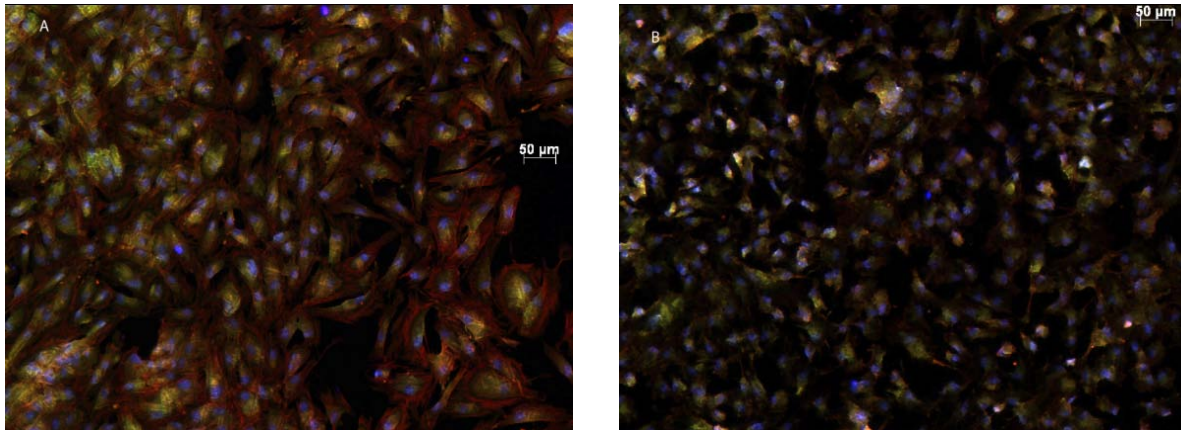
Es ließen sich unabhängig von den genutzten Gasparametern und der Oberflächenbeschaffenheit eine höhere Anzahl Zellen auf den bestrahlten Titanprobekörpern im Vergleich zu den mit dem Reaktivgas ohne Zündung behandelten Proben feststellen ( $p = 0,018$ , Abb. 22). Bei Betrachtung der Gasparameter zeigte sich kein Unterschied ( $p = 0,645$ , Abb. 23). Der Vergleich der beiden Oberflächen bei den bestrahlten Titanproben zeigte einen signifikanten Unterschied bezüglich der Oberflächenbeschaffenheit ( $p = 0,038$ ). Hier wiesen die mikrostrukturierten Oberflächen eine höhere Zellanzahl auf als die maschinerten Oberflächen (Abb. 24).



**Abb. 22:** Vergleich der Zellanzahl nach 4 Stunden zwischen bestrahlten Proben und Kontrollen (Mittelwert und Standardabweichung).



**Abb. 23:** Auswertung der Zellanzahl nach 4 Stunden, Mittelwerte und Standardabweichung.



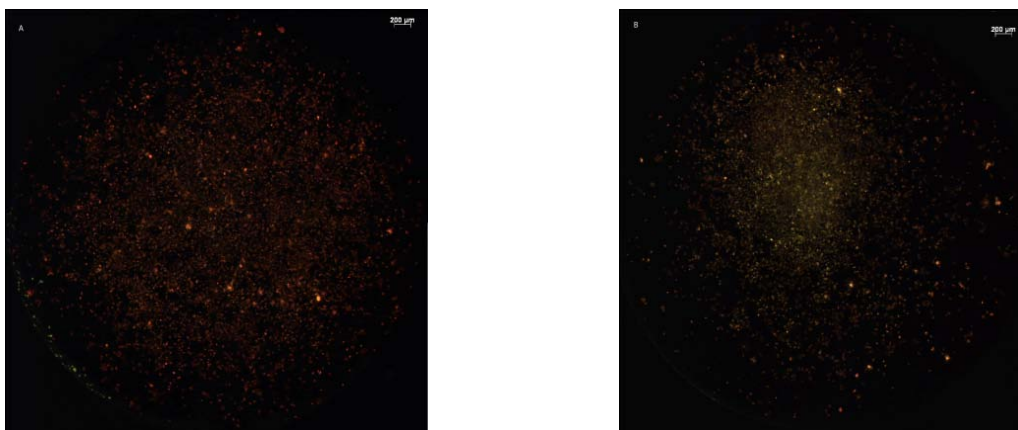
**Abb. 24:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 4 Stunden Kultivierung: Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung.

**A:** Maschinierete, bestrahlte ( $O_2N_2$ ) Titanprobe. Gleichmäßige Bedeckung mit Gingivafibroblasten, längliche Zellkörper.

**B:** Mikrostrukturierte, bestrahlte ( $O_2N_2$ ) Titanprobe. Gleichmäßige Bedeckung mit Gingivafibroblasten, eher rundliche Zellkörper.

### Fluoreszenzmikroskopie / relative Prüfkörperbedeckung

Die 4 Stunden Ergebnisse zeigten eine Besiedelung aller Titanplatten mit Gingivafibroblasten. Dabei stellten sich signifikante Unterschiede in der Bedeckung zwischen bestrahlten Probekörpern und unbestrahlten Kontrollen dar ( $p = 0,0003$ , Tabelle 6). Die Zellen besiedelten die Oberfläche der bestrahlten Titanproben über eine größere Fläche als die unbestrahlten Oberflächen (Abb. 25). Hier siedelten sich die Fibroblasten kompakt an der Applikationsstelle an.



**Abb. 25:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 4 Stunden Kultivierung: Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung.

**A:** Mikrostrukturierte, bestrahlte ( $O_2N_2$ ) Titanprobe. Homogene Bedeckung der Oberfläche mit Gingivafibroblasten.

**B:** Mikrostrukturierte, ohne Zündung der Trägergase mitgeführte Titanprobe. Verteilung der Zellen auf der Titanoberfläche weniger dicht und ungleichmäßig. Die meisten Zellen befinden sich am Applikationsort.

**Tabelle 6:** Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Prüfkörperbedeckung nach 4 Stunden

<b>Relative Prüfkörperbedeckung</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
Bestrahlte Proben	<b>46,73 %</b>	9,31
Kontrollen	<b>20,32 %</b>	6,94
maTi	<b>53,13 %</b>	11,58
SLA	<b>40,32 %</b>	9,24
O <sub>2</sub> maTi	<b>46,5 %</b>	13,21
O <sub>2</sub> SLA	<b>38,33 %</b>	8,85
O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> maTi	<b>59,76 %</b>	4,63
O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> SLA	<b>42,32 %</b>	10,5
Kontrollen maTi	<b>32,13 %</b>	6,25
Kontrollen SLA	<b>19,67 %</b>	8,31

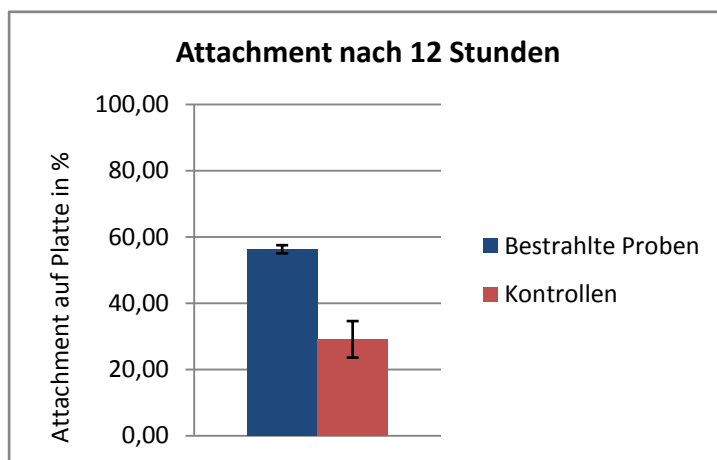
Es zeigten sich bei der Homogenität der bestrahlten Probekörper Unterschiede zwischen den Oberflächen und den Gasparametern. So wiesen die maschinieren Oberflächen nach Bestrahlung sowohl mit der Gasmischung O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (2000 sccm Helium, 250 sccm Stickstoff und 10 sccm Sauerstoff) wie auch mit der Gasmischung O<sub>2</sub> (2000 sccm Helium und 5 sccm Sauerstoff) eine signifikant bessere Besiedelung auf als die mikrostrukturierten bestrahlten Oberflächen ( $p = 0,046$ ). Der Vergleich der beiden Reaktivgaszusammensetzungen (O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> gegen O<sub>2</sub>) miteinander ergab einen nicht signifikanten ( $p = 0,141$ ) Unterschied. Es zeigte sich ein leichter Vorteil für die Gasmischung O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. Bei Betrachtung der Oberflächenmodifikationen (maTi gegen SLA) im Vergleich bestrahlt gegen unbestrahlt stellten sich die maschinieren Oberflächen als tendenziell vorteilhafte Topografie heraus. Dies war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,14$ ).

### **Kultivierung 12 Stunden**

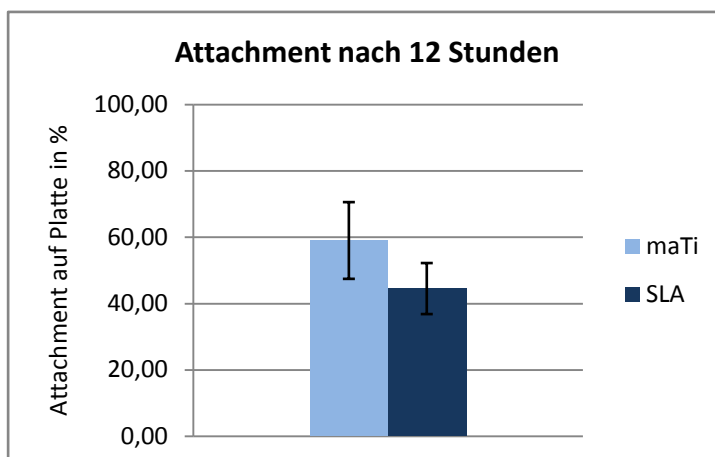
#### **Fluoreszenzmikroskopie / fokale Adhäsion (Vinculin)**

Nach 12 Stunden ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den bestrahlten Proben und den unbestrahlten Kontrollen nachweisen ( $p = 0,02$ ). Die Zellen auf den bestrahlten Proben wiesen bei beiden Gasmischungen größere Attachmentflächen auf als auf den ohne Zündung der Trägergase mitgeführten Kontrollen (Abb. 26, 29). Zusätzlich zeigten sich signifikante

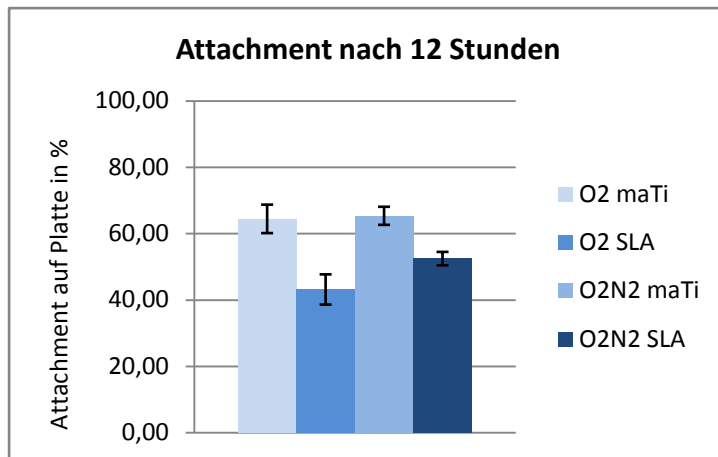
Unterschiede bei Betrachtung der Oberflächenbeschaffenheit gegeneinander ( $p = 0,006$ ). So ergaben sich größere Attachmentflächen auf den maschinieren Titanprobekörpern (maTi) als auf den mikrostrukturierten (SLA). Dies bestätigte sich bei Betrachtung der der bestrahlten Proben ( $p = 0,003$ , Abb. 27), während sich bei den mitgeführten Kontrollen kein signifikanter Unterschied zwischen den Oberflächenkonfigurationen nachweisen ließ ( $p = 0,386$ ). Für die Reaktivgaszusammensetzung  $O_2$  ergaben sich ein Vorteil für die maschinieren Proben (maTi  $O_2$  vs. SLA  $O_2$ :  $p = 0,021$ , Abb. 28). Bei Vergleich der beiden Gasmischungen unabhängig von der Oberflächentextur konnte kein Unterschied erkannt werden ( $p = 0,418$ ).



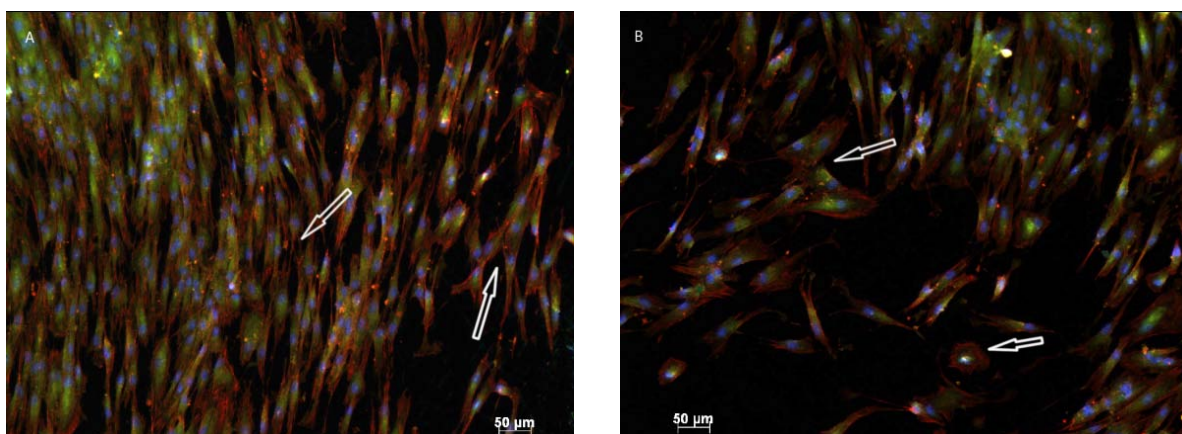
**Abb. 26:** Relativer Anteil fokaler Kontaktflächen (Vinculin) nach 12 Stunden Kultivierung. Mittelwerte und Standardabweichung im Vergleich Plasmabestrahlung zu unbehandelten Proben.



**Abb. 27:** Relativer Anteil fokaler Kontaktflächen (Vinculin) nach 12 Stunden Kultivierung. Vergleich der bestrahlten Proben in Abhängigkeit von Oberflächenbeschaffenheiten: Mittelwerte und Standardabweichung.



**Abb. 28:** Relativer Anteil fokaler Kontaktflächen (Vinculin) nach 12 Stunden Kultivierung. Reaktivgaszusammensetzung und Oberflächenbeschaffenheiten: Mittelwerte und Standardabweichung.



**Abb. 29:** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten auf maschinierter Titanoberflächen nach 12 Stunden Kultivierung (Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung).

**A:** Bestrahlte Probe (Gasmischung O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>). Pfeile: flächiges Attachment der länglichen Zellen. Zellen treten untereinander in Kontakt.

**B:** Mitgeführte Kontrolle, Gasstrom ohne Plasmazündung. Pfeile: rundliche Zellen mit punktuelltem Attachment.

### Fluoreszenzmikroskopie / Zellgröße

Die bestrahlten Proben wiesen im Mittel zwar größere Zellkörper auf als die unbestrahlten Kontrollen (Mittelwert bestrahlte Proben:  $3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ , Mittelwert Kontrollen:  $2 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ ) (Abb. 30, Tabelle 7). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,192$ ). Nach 12 Stunden war der Unterschied zwischen den bestrahlten Proben hinsichtlich der Gasmischung und Oberflächentopographie nicht signifikant (maTi O<sub>2</sub> vs. maTi O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>:  $p = 0,114$ ; SLA O<sub>2</sub> vs. SLA O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>:  $p = 0,0571$ ). Der Vergleich der Oberflächenbeschaffenheit bei den bestrahlten

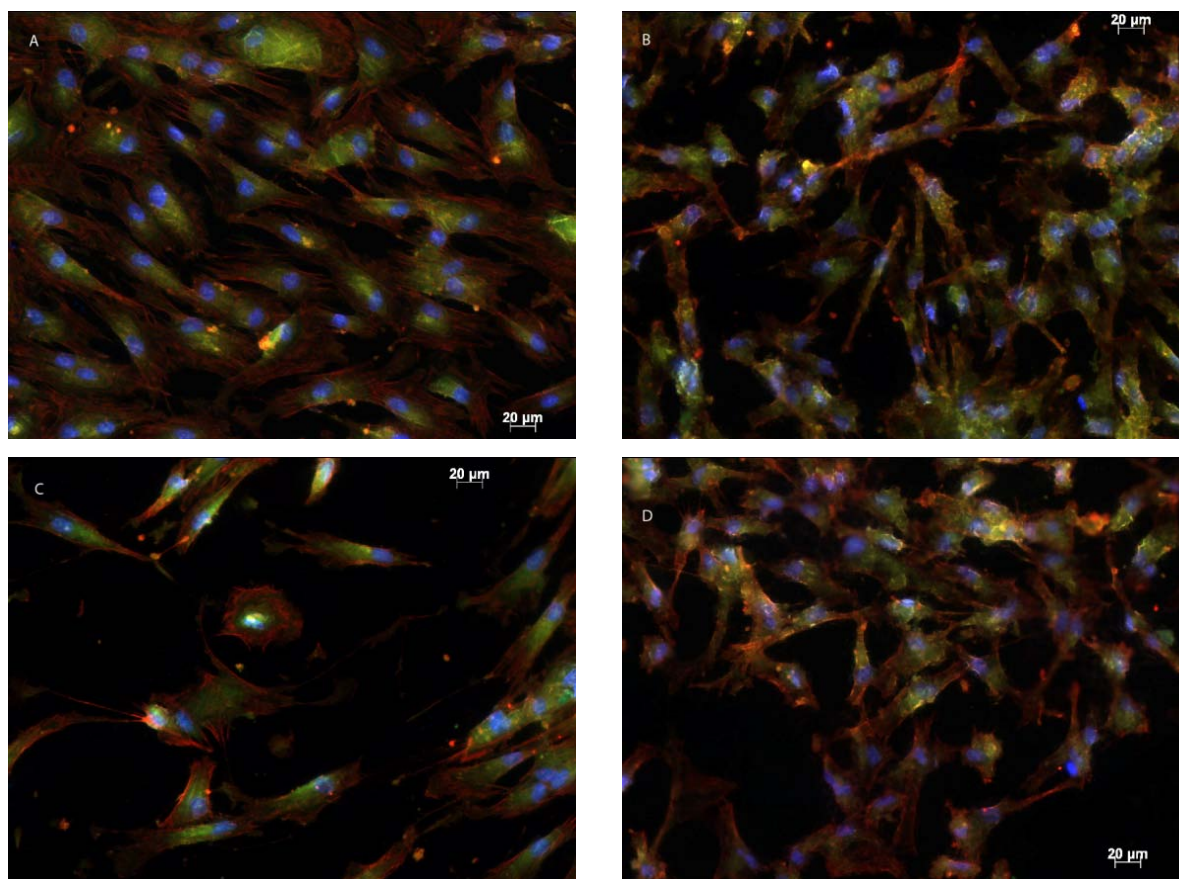
Proben ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,161$ ). Die Betrachtung der bestrahlten Oberflächen zu den unbestrahlten Kontrollen zeigte ebenfalls keinen signifikanten Vorteil (maTi bestrahlt vs. maTi unbestrahlt:  $p = 0,214$ ; SLA bestrahlt vs. SLA unbestrahlt:  $p = 0,461$ ).

**Tabelle 7:** Übersicht über die Mittelwerte der Zellgröße nach 12 Stunden

<b>Zellgröße, 12 Stunden</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
Bestrahlte Proben	$3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
Kontrollen	$2 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$4 \times 10^{-5}$
maTi	$4 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
SLA	$2 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$2 \times 10^{-5}$
O <sub>2</sub> maTi	$5 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
O <sub>2</sub> SLA	$3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> maTi	$3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$2 \times 10^{-4}$
O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> SLA	$2 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
Kontrollen maTi	$3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-5}$
Kontrollen SLA	$2 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$

Der Vergleich der Reaktivgasmischungen erbrachte unabhängig der Oberflächenbeschaffenheit einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,01$ ). Die Gasmischung O<sub>2</sub> (2000 sccm Helium und 5 sccm Sauerstoff) bewies sich als vorteilhaft.





**Abb. 30:** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten auf Titanoberflächen nach 12 Stunden Kultivierung (Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung).

**A:** Maschinerte, bestrahlte (Gasmischung  $O_2N_2$ ) Titanprobe mit länglichen Gingivafibroblasten.

**B:** Mikrostrukturierte, bestrahlte (Gasmischung  $O_2$ ) Titanprobe mit kleineren Zellkörpern.

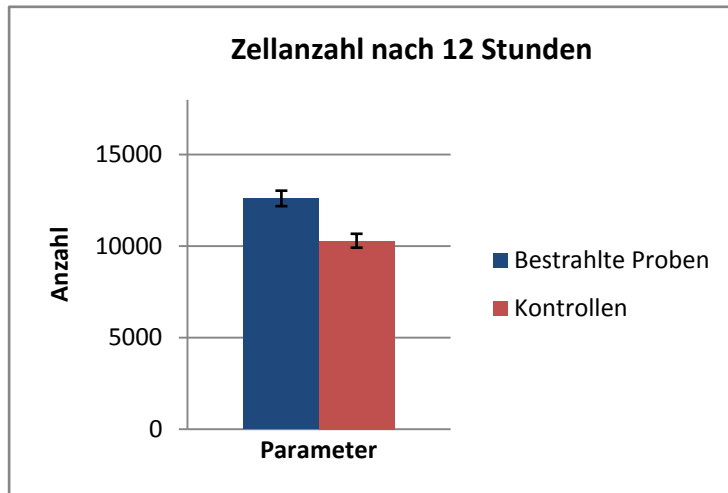
**C:** Maschinerte, unbestrahlte Titanprobe mit rundlichen Gingivafibroblasten.

**D:** Mikrostrukturierte, ohne Zündung der Trägergase mitgeführte Titanprobe mit kleinerer Zellkonfiguration.

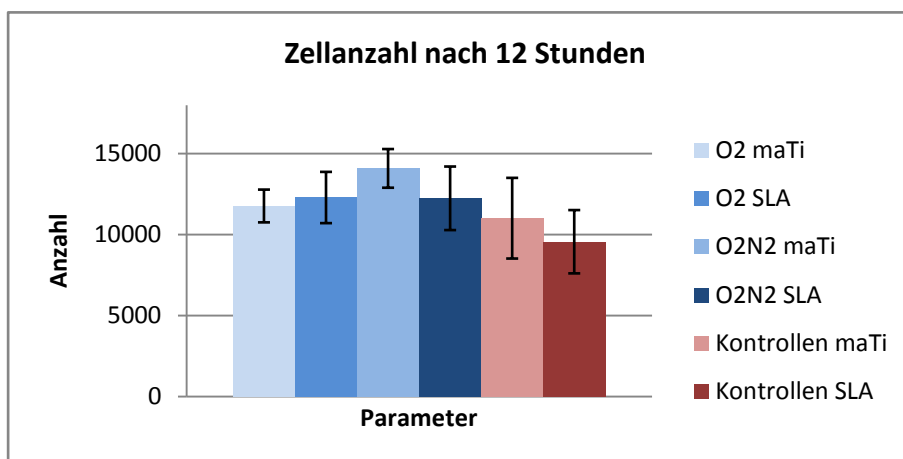
### Fluoreszenzmikroskopie / Zellanzahl

Nach 12 Stunden zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie nach 4 Stunden. Die bestrahlten Proben wiesen eine signifikant höhere Anzahl Fibroblasten auf als die nur mit ungezündetem Gasfluss behandelten Proben ( $p = 0,006$ , Abb. 31). Bei Betrachtung der Gasparameter stellte sich kein Unterschied für die Gasmischungen heraus ( $p = 0,478$ ). Der Vergleich der Oberflächenkonfiguration zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Topographien ( $p = 0,478$ , Abb. 32).





**Abb. 31:** Vergleich der Zellanzahl zwischen bestrahlten Titanproben und mitgeführten Kontrollen nach 12 Stunden (Mittelwerte und Standardabweichung).



**Abb. 32:** Auswertung der Zellanzahl nach 12 Stunden, Mittelwerte und Standardabweichung.

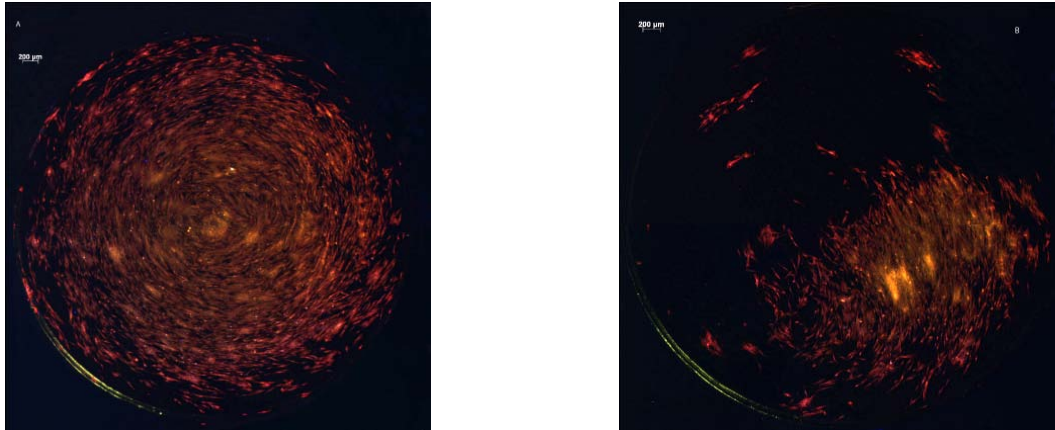
### Fluoreszenzmikroskopie / relative Prüfkörperbedeckung

Es zeigte sich nach 12 Stunden eine höhere relative Bedeckung der bestrahlten Titanoberflächen, der Unterschied zu den mitgeführten Kontrollen war signifikant ( $p = 0,003$ , Tabelle 8). Die Besiedelung der Gingivafibroblasten auf den unbestrahlten Kontrollen stellte sich im Vergleich zu den bestrahlten Titanproben als lokalisiert heraus (Abb. 33). Der Zellteppich war auf den bestrahlten Proben flächiger als auf den Kontrollen. Wiederum keine Unterschiede ( $p = 0,529$ ) ließen sich zwischen den beiden Gasparametern erkennen. Die Auswertung zwischen der Beschaffenheit der Titanoberflächen nach 12 Stunden ergab für die maschinieren

Oberflächen ein signifikant (maTi MW: 69,04%  $\pm$  3,56; SLA MW: 46,09%  $\pm$  16;  $p = 0,009$ ) höheres Ergebnis als für die mikrostrukturierten Oberflächen. Dies bestätigte sich bei Betrachtung der einzelnen Reaktivgasmischungen. Es konnte zusätzlich ein Unterschied zwischen den Oberflächenbeschaffenheiten erkannt werden. So wiesen bei beiden Gasmischungen die maschinerte Topographie eine bessere Bedeckung auf (maTi O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> vs. SLA O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>:  $p = 0,021$ ; Gruppe maTi O<sub>2</sub> vs. Gruppe SLA O<sub>2</sub>:  $p = 0,021$ ).

**Tabelle 8:** Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Prüfkörperbedeckung nach 12 Stunden

<b>Relative Prüfkörperbedeckung</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
Bestrahlte Proben	<b>57,56 %</b>	20,02
Kontrollen	<b>27,87 %</b>	15,95
maTi	<b>69,04 %</b>	3,56
SLA	<b>46,09 %</b>	16,0
O <sub>2</sub> maTi	<b>69,0 %</b>	3,60
O <sub>2</sub> SLA	<b>56,97 %</b>	1,86
O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> maTi	<b>69,08 %</b>	4,08
O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> SLA	<b>35,21 %</b>	16,68
Kontrollen maTi	<b>32,37 %</b>	24,18
Kontrollen SLA	<b>23,37 %</b>	17,24



**Abb. 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 12 Stunden Kultivierung: Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung.**

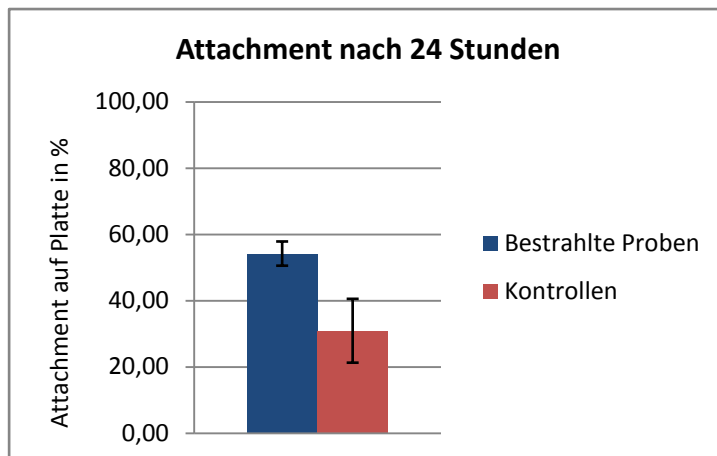
**A: Maschinerte, bestrahlte (O<sub>2</sub>) Titanprobe. Regelmäßiger Zellteppich auf der Probe erkennbar.**

**B: Maschinerte, ohne Zündung der Trägergase mitgeführte Titanprobe. Zellen auf der Titanoberfläche lokalisiert am Applikationsort.**

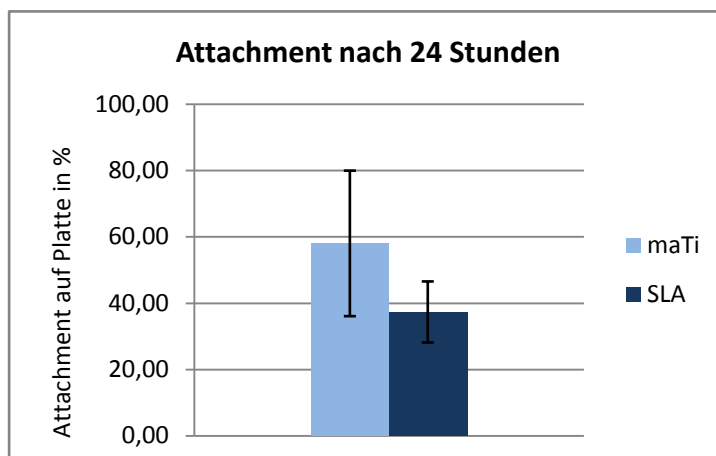
### *Kultivierung 24 Stunden*

#### **Fluoreszenzmikroskopie / fokale Adhäsion (Vinculin)**

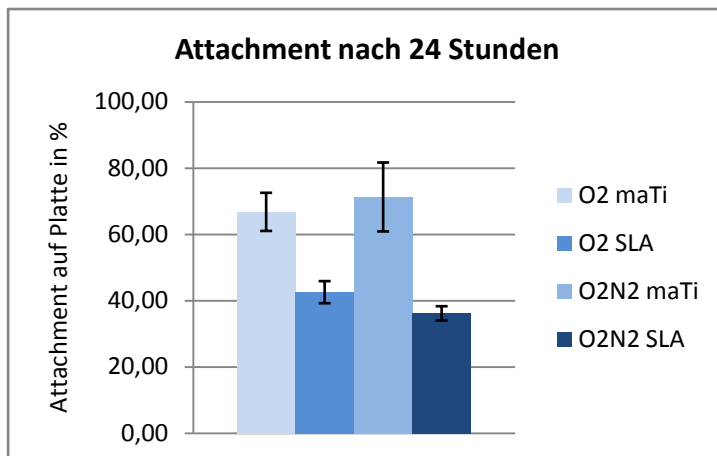
Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den bestrahlten Proben und den mitgeführten Kontrollen ( $p = 0,012$ , Abb. 34). Die bestrahlten Proben wiesen größere Attachmentflächen der Zellen auf als die ohne Zündung der Trägergase behandelten Kontrollen (Abb. 37). Die vorangegangenen signifikanten Ergebnisse bei Betrachtung der Oberflächenkonfigurationen gegeneinander mit höheren Werten für die maschinerten Prüfkörper bestätigten sich in den Untersuchungen über 24 Stunden ( $p = 0,014$ , Abb. 35). Bei den bestrahlten Proben bewiesen die Zellen ein deutlicheres Attachment auf den maschinerten Oberflächen als auf den mikrostrukturierten (maTi O<sub>2</sub> vs. SLA O<sub>2</sub>:  $p = 0,029$ ; maTi O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> vs. SLA O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>:  $p = 0,029$ ). Das Attachmentverhalten in Abhängigkeit von der Gaszusammensetzungen zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,916$ , Abb. 36).



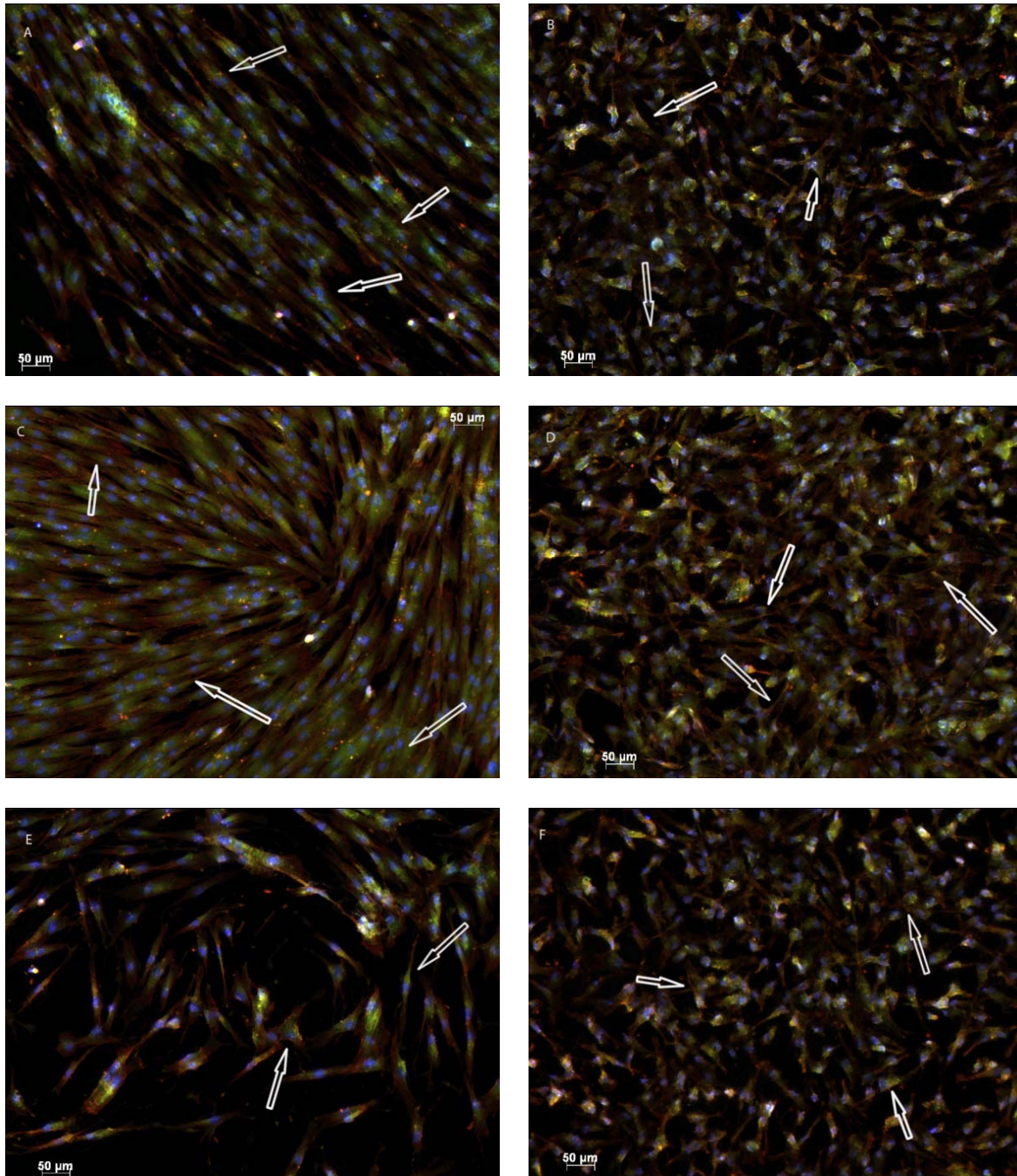
**Abb. 34:** Relativer Anteil fokaler Kontaktflächen (Vinculin) nach 24 Stunden Kultivierung. Mittelwerte und Standardabweichung im Vergleich Plasmabestrahlung zu unbehandelten Kontrollen.



**Abb. 35:** Relativer Anteil fokaler Kontaktflächen (Vinculin) nach 24 Stunden Kultivierung. Vergleich der Oberflächenkonfiguration: Mittelwerte und Standardabweichung.



**Abb. 36:** Relativer Anteil fokaler Kontaktflächen (Vinculin) nach 24 Stunden Kultivierung. Vergleich der bestrahlten Proben in Abhängigkeit von Reaktivgaszusammensetzung und Oberflächenbeschaffenheiten: Mittelwerte und Standardabweichung.



**Abb. 37:** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten nach 24 Stunden Kultivierung (Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung).

**A:** Maschinerte, mit der Reaktivgasmischung  $O_2$  bestrahlte Probe. Pfeil: ausgeprägtes flächiges Attachment der einzelnen Zellen, längliche Konfiguration.

**B:** Mikrostrukturierte, mit der Reaktivgasmischung  $O_2$  bestrahlte Probe. Pfeil: kompakter Zellaufbau der Fibroblasten, ebenfalls flächiges Attachment über den gesamten Zellkörper.

**C:** Maschinerte, mit der Reaktivgasmischung  $O_2/N_2$  bestrahlte Titanprobe. Pfeil: längliche Zellkörper, dichtes und flächiges Attachment.

**D:** Mikrostrukturierte, mit der Reaktivgasmischung  $O_2/N_2$  bestrahlte Probe. Pfeil: rundliche Zellen, flächiges Attachment über den gesamten Zellkörper.

**E:** Maschinerte, mitgeführte Kontrolle ohne Zündung der Trägergase behandelte Probe. Pfeil: geringeres Attachment der Fibroblasten als auf den bestrahlten Proben.

**F:** Mikrostrukturierte, ohne Zündung der Trägergase mitgeführte Titanprobe. Pfeil: kleinerer Zellkonfiguration, punktuell Attachment.

### Fluoreszenzmikroskopie / Zellgröße

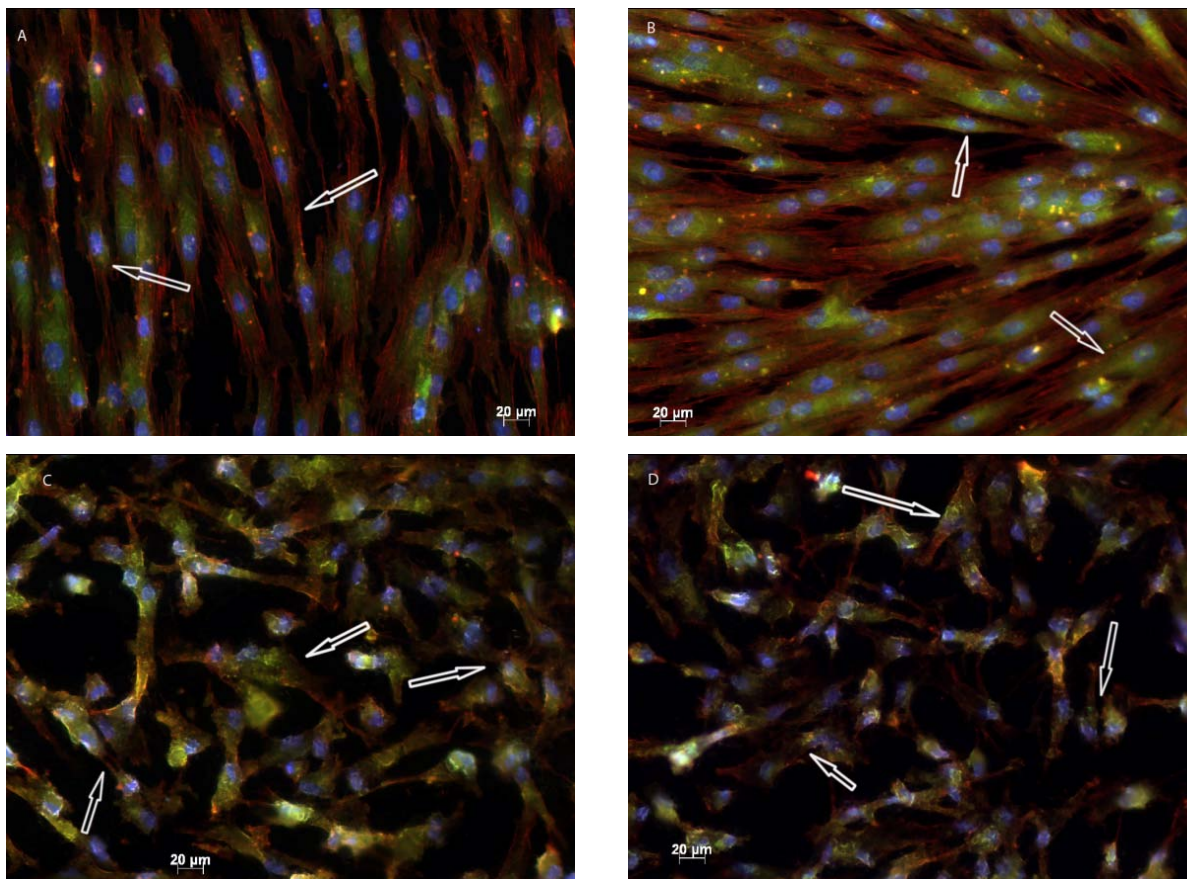
Die Untersuchung der Zellgröße nach 24 Stunden ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den bestrahlten Proben hinsichtlich der Gasmischung (maTi O<sub>2</sub> vs. maTi O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>: p = 0,574; SLA O<sub>2</sub> vs. SLA O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>: p = 0,645). Im Mittel wiesen die Fibroblasten auf den bestrahlten Proben kleinere Zellkörper auf (Mittelwert bestrahlte Proben:  $3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ , Mittelwert Kontrollen:  $4 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ ). Es ließ sich kein signifikanter Vorteil durch die Plasmabestrahlung erkennen (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Übersicht über die Mittelwerte der Zellgröße nach 24 Stunden

<b>Zellgröße, 24 Stunden</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
Bestrahlte Proben	$3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
Kontrollen	$4 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
maTi	$5 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
SLA	$3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
O <sub>2</sub> maTi	$4 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$5 \times 10^{-5}$
O <sub>2</sub> SLA	$3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$5 \times 10^{-5}$
O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> maTi	$4 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$
O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> SLA	$3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$2 \times 10^{-4}$
Kontrollen maTi	$6 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$2 \times 10^{-4}$
Kontrollen SLA	$2 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$	$1 \times 10^{-4}$

Auf den maschinieren Oberflächen zeigten sich signifikant größere Zellen als auf den mikrostrukturierten Oberflächen (p = 0,0006, Abb. 38). Die Analyse der Gasmischungen ergab ähnliche Ergebnisse wie nach 12 Stunden. So erwiesen sich die Zellen auf den bestrahlten Oberflächen bei der Gasmischung O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (2000 sccm Helium, 250 sccm Stickstoff und 10 sccm Sauerstoff) gleich groß im Vergleich zu der Gasmischung O<sub>2</sub> (2000 sccm Helium und 5 sccm Sauerstoff). Dies war nicht signifikant (p = 0,879).





**Abb. 38:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 24 Stunden Kultivierung: Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung.

**A:** Maschinerte bestrahlte ( $O_2$ ) Titanprobe. Pfeile: längliche Zellmorphologie.

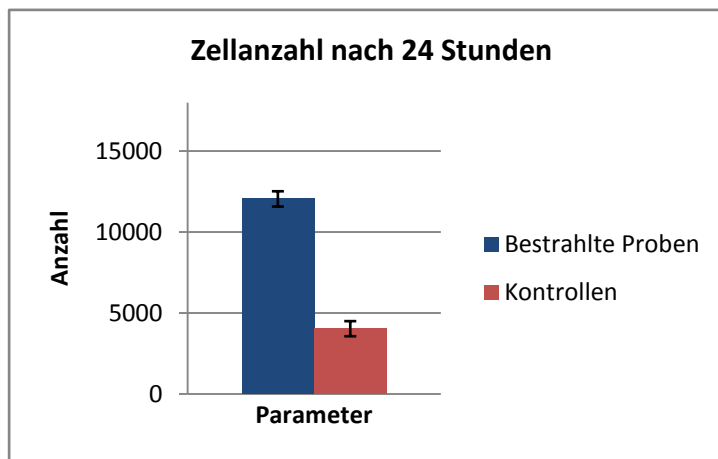
**B:** Maschinerte bestrahlte ( $O_2N_2$ ) Probe. Pfeile: längliche Zellkonfiguration der Gingivafibroblasten.

**C, D:** SLA bestrahlte (C =  $O_2N_2$  / D =  $O_2$ ) Titanprobe mit kompakteren Zellkörpern.

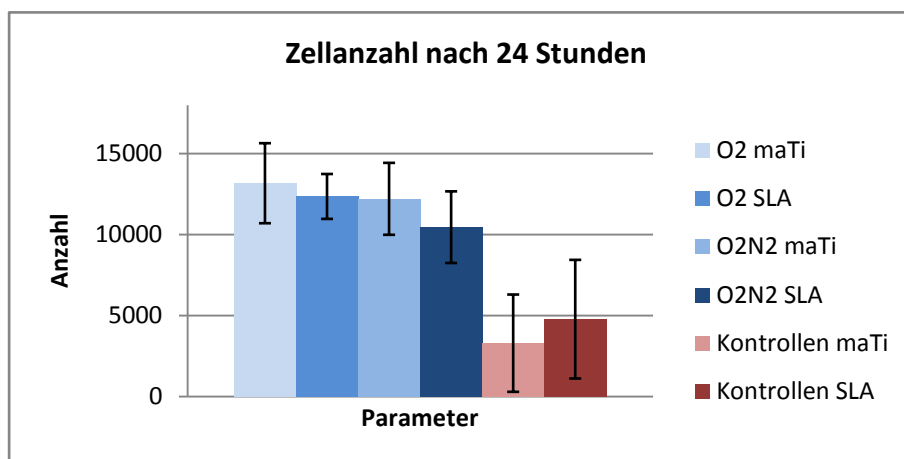
### Fluoreszenzmikroskopie / Zellanzahl

Nach 24 Stunden bestätigten sich die vorangegangenen Ergebnisse teilweise. Hier bewies sich ein signifikanter Vorteil zugunsten der Bestrahlung ( $p < 0,0001$ ). Die Zellanzahl bei den bestrahlten Probekörpern war höher als bei den unbestrahlten Proben, unabhängig davon, welche Gasmischung benutzt wurde (Abb. 39, 41). Die Betrachtung der Oberflächenbeschaffenheit zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,748$ ). So wiesen die maschinerten und mikrostrukturierten Proben eine ähnliche Anzahl an Gingivafibroblasten auf ( $p = 0,442$ , Abb. 40). Zwischen den Gasmischungen ließ sich kein Vorteil ( $p = 0,195$ ) nach 24 Stunden feststellen.

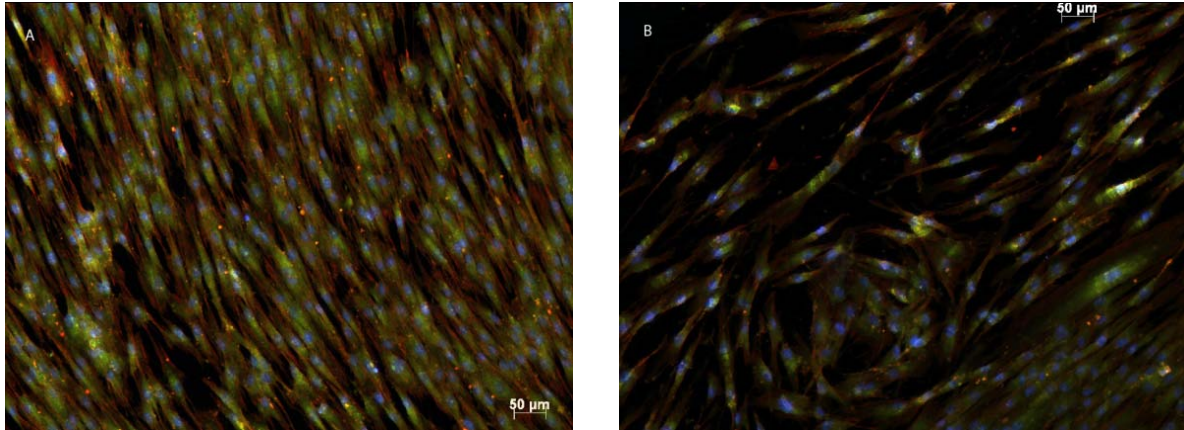




**Abb. 39:** Vergleich der Fibroblastenanzahl auf den bestrahlten Proben und mitgeführten Kontrollen nach 24 Stunden (Mittelwert und Standardabweichung).



**Abb. 40:** Auswertung der Zellanzahl nach 24 Stunden, Mittelwerte und Standardabweichung.



**Abb. 41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 24 Stunden Kultivierung: Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung.**

**A: Maschinerte, bestrahlte ( $O_2N_2$ ) Titanprobe. Dichte Bedeckung mit Gingivafibroblasten, längliche Zellkörper, die zueinander Kontakt suchen. Zellkörper nahe aneinander gelagert.**

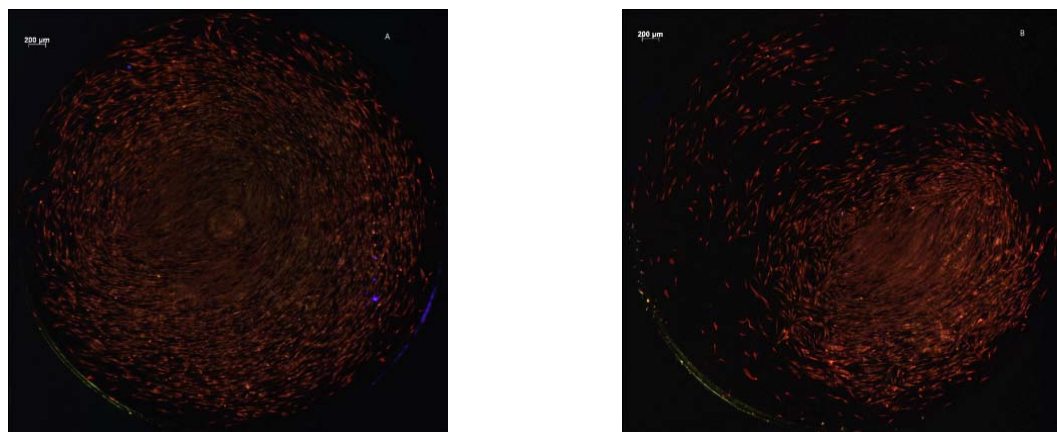
**B: Maschinerte, ohne Zündung der Trägergase mitgeführte Titanprobe. Zellen weniger dicht wachsend.**

#### **Fluoreszenzmikroskopie / relative Prüfkörperbedeckung**

Nach 24 Stunden zeigte sich eine Vermehrung der Zellen. Vor allem auf den maschinerten Probekörpern bildete sich ein dichter Zellteppich auf der gesamten Probenoberfläche (Abb. 42, Tabelle 10). Die Bedeckung der mikrostrukturierten Proben stellte sich etwas weniger dicht dar. Auf den unbestrahlten Kontrollen zeigte sich die Bedeckung weiterhin lokalisiert um den Applikationspunkt herum.

**Tabelle 10:** Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Prüfkörperbedeckung nach 24 Stunden

<i>Relative Prüfkörperbedeckung</i>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
Bestrahlte Proben	<b>54,67 %</b>	8,69
Kontrollen	<b>14,51 %</b>	10,35
maTi	<b>61,95 %</b>	4,71
SLA	<b>47,39 %</b>	7,62
O <sub>2</sub> maTi	<b>61,04 %</b>	3,62
O <sub>2</sub> SLA	<b>44,84 %</b>	4,61
O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> maTi	<b>62,86 %</b>	6,05
O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> SLA	<b>49,93 %</b>	9,85
Kontrollen maTi	<b>13,89 %</b>	15,05
Kontrollen SLA	<b>15,12 %</b>	11,76



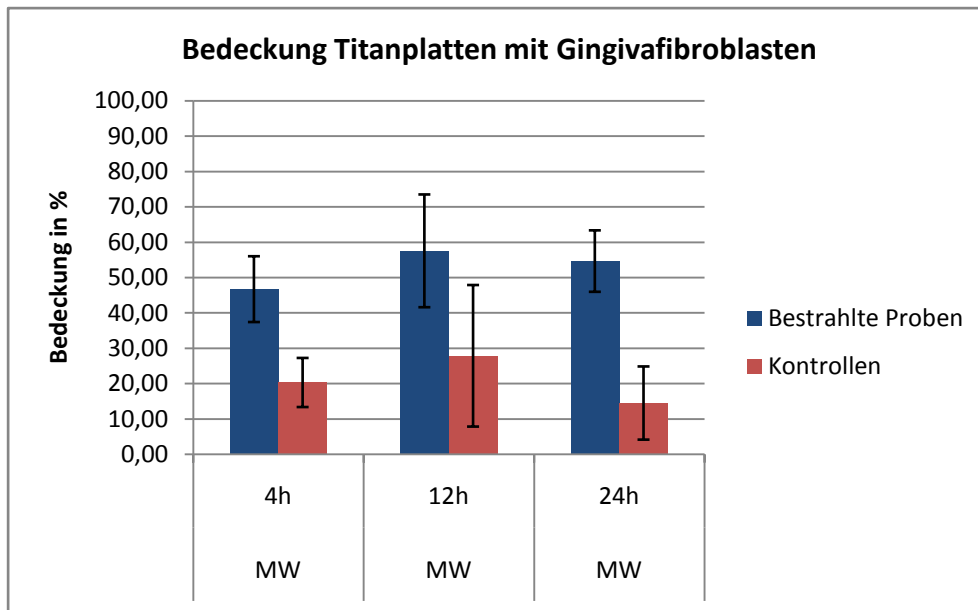
**Abb. 42:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 24 Stunden Kultivierung: Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung.

**A:** Maschinerte, bestrahlte (O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) Titanprobe. Dichter Zellteppich von Gingivafibroblasten sichtbar, im Zentrum mehrlagig.

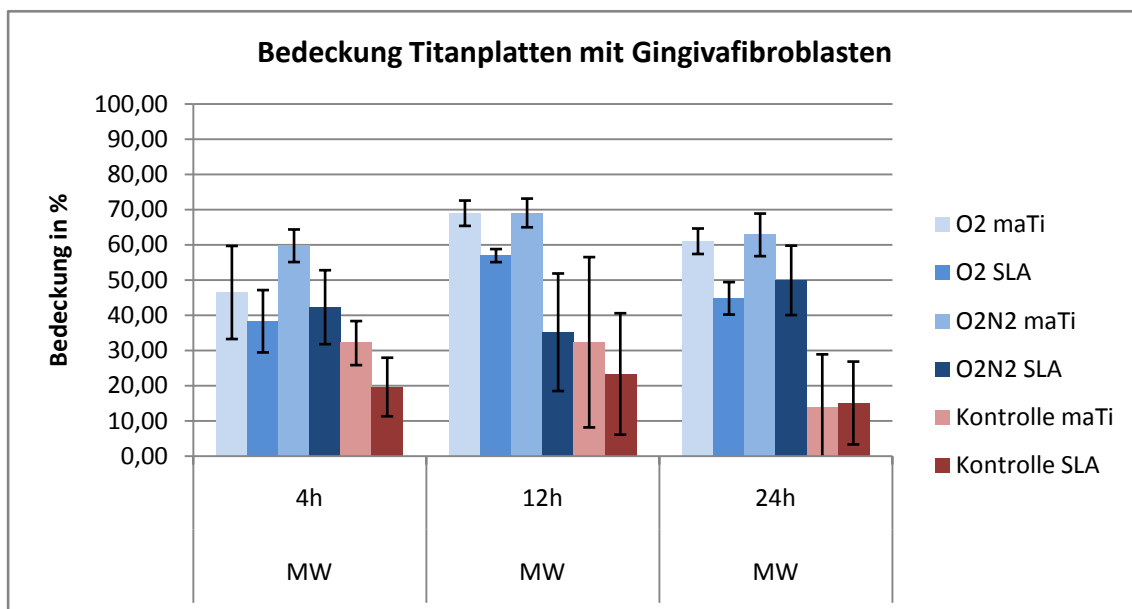
**B:** Maschinerte, unbestrahlte (O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) Titanprobe im Vergleich.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Proben ( $p = 0,0003$ , Abb. 43). Die Probekörper, die mit Plasma bestrahlt wurden, wiesen eine flächigere Bedeckung auf. Ein signifikant dichteres und flächigeres Wachstum stellte sich auf den maschinerten Oberflächen dar ( $p = 0,005$ , Abb. 44). Dies konnte bei den mitgeführten Kontrollen, die ohne Zündung der Trägergase behandelt wurden, nicht nachgewiesen werden

( $p = 0,827$ ). Der Vergleich der beiden Gasmischungen zeigte keinen Vorteil für eine der Gasmischungen ( $p = 0,529$ ).



**Abb. 43:** Übersicht über die Bedeckung nach 4, 12 und 24 Stunden. Mittelwerte und Standardabweichung.



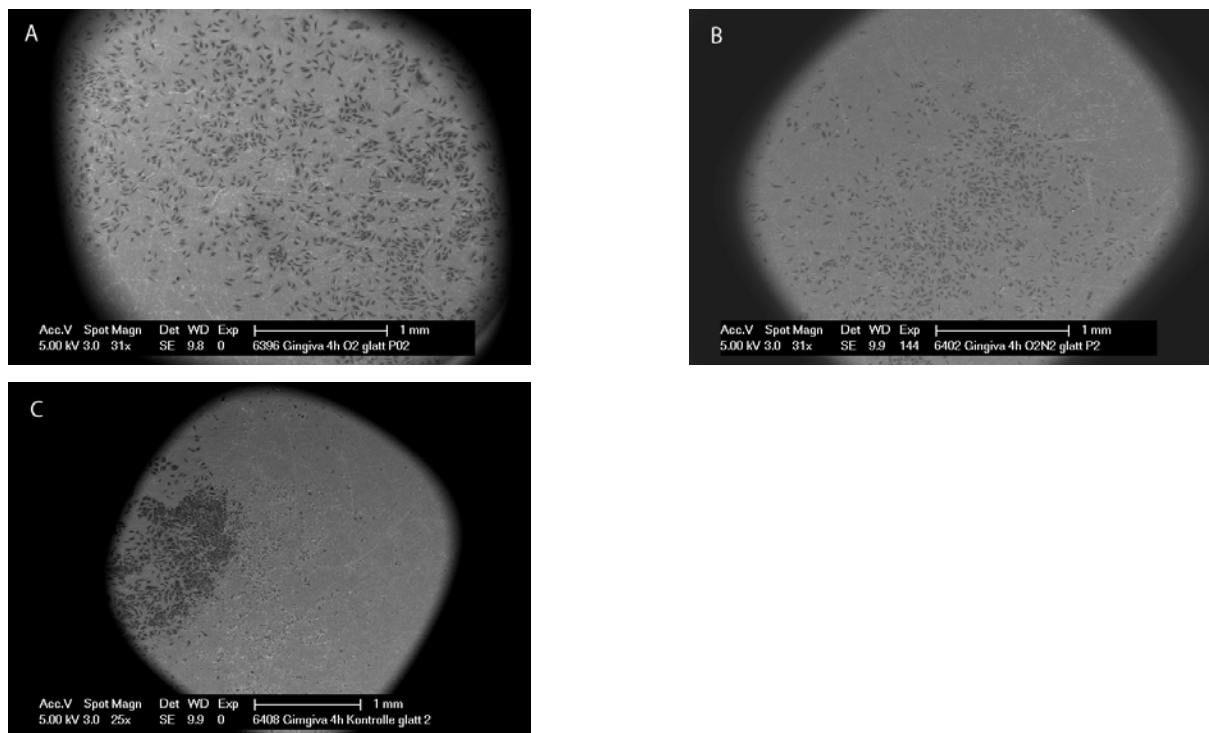
**Abb. 44:** Übersicht über die Bedeckung nach 4, 12 und 24 Stunden; Mittelwerte und Standardabweichung. Vergleich aller Gasparameter und Kontrollen miteinander.

## 4.2 Zellmorphologie

### *Kultivierung 4 Stunden*

#### **Rasterelektronenmikroskopie (Verteilung, Morphologie)**

Nach 4 Stunden konnten auf allen Prüfkörpern Fibroblasten nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich auf den bestrahlten Proben eine homogene Besiedelung im Vergleich zu den Proben, die ohne Zündung der Prozessgase behandelt wurden (Abb. 45). Es konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen den Gasparametern erkannt werden.



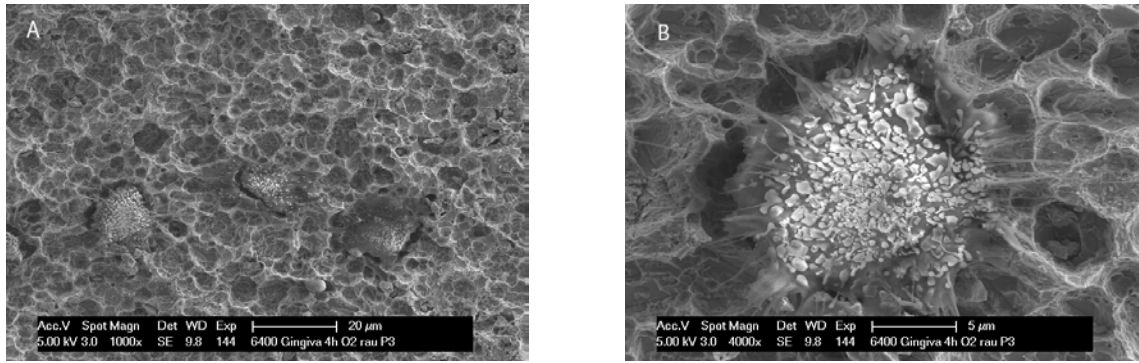
**Abb. 45:** Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen maschinierter Titanproben nach 4 Stunden Kultivierung.

**A:** Bestrahlte Titanprobe mit der Gasmischung  $O_2$ ; gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Titanoberfläche.

**B:** Bestrahlte Titanprobe mit der Gasmischung  $O_2N_2$ ; ebenfalls gleichmäßige Verteilung der Zellen.

**C:** Mitgeführte Kontrolle, Gasmischung  $O_2$ ; Zellen siedeln sich aufgrund der geringen Oberflächenbenetzbarkeit des Titans am Applikationspunkt an.

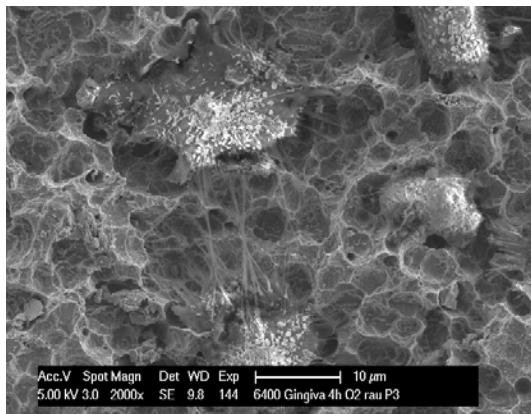
In der Vergrößerung zeigte sich, dass die Gingivafibroblasten in die Mikrostruktur der Oberfläche einwuchsen (Abb. 46). Zusätzlich begannen sie nach 4 Stunden in Kontakt untereinander zu treten (Abb. 47). Morphologisch differierten die Zellen auf den bestrahlten Oberflächen im Vergleich zu den Kontrollen. Es waren flächige Anlagerung und ausgeprägte Ausläufer zu erkennen (Abb. 48).



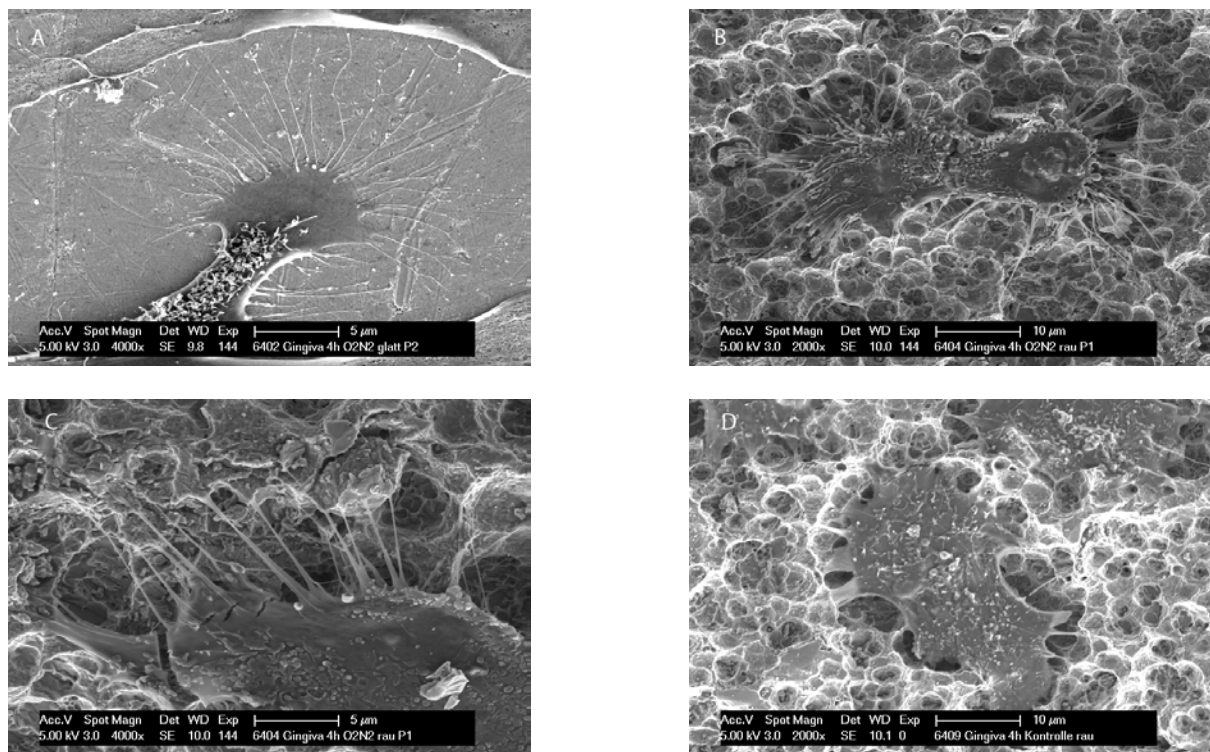
**Abb. 46:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von mit Gasmischung O<sub>2</sub> bestrahlten mikrostrukturierten Titanoberflächen nach 4 Stunden Kultivierung.

A: Übersichtsaufnahme (1000x).

B: Einzelner Fibroblast (4000x), Ausläufer der Fibroblasten in die Mikrostruktur der Oberfläche.



**Abb. 47:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mit Gasmischung O<sub>2</sub> bestrahlten mikrostrukturierten Titanoberfläche nach 4 Stunden Kultivierung. Fibroblasten beginnen Kontakt untereinander zu suchen.



**Abb. 48: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (2000x – 4000x) nach 4 Stunden Kultivierung.**

**A: Maschinerte Titanprobe (Gasmischung O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>). Fibroblast mit zahlreichen grazilen Zellausläufern.**

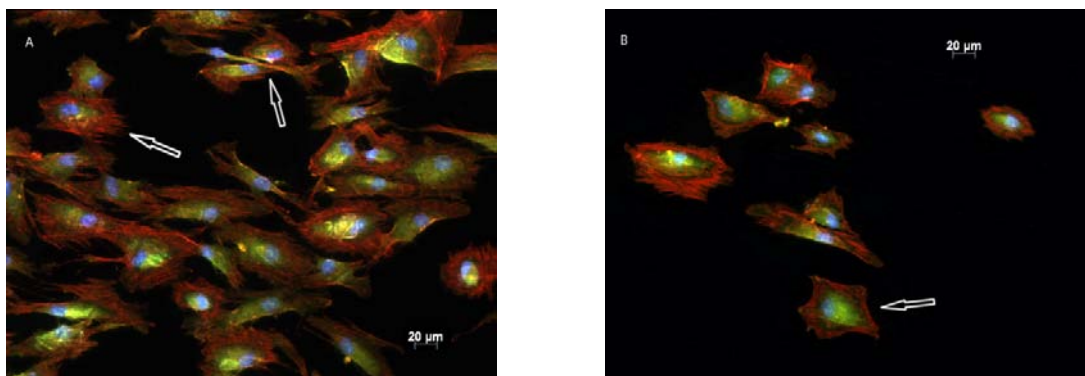
**B: SLA Titanprobe (Gasmischung O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>). Fibroblast mit zahlreichen grazilen Zellausläufern.**

**C: Detailvergrößerung von B.**

**D: SLA ohne Zündung der Trägergase behandelt. Fibroblast mit weniger Zellausläufern.**

### **Fluoreszenzmikroskopie (Morphologie)**

Morphologisch wiesen die Zellen auf den bestrahlten Oberflächen ein flaches, längliches Wachstum im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen auf. Auf maschinerten Oberflächen zeigten die Gingivafibroblasten die länglichste Konfiguration, während sie auf den mikrostrukturierten Proben einen etwas rundlicheren Aufbau beschrieben (Abb. 49). Diese Unterschiede bestätigten sich auch auf den Proben, die mit den Reaktivgasen ohne Zündung des Plasmas bestrahlt wurden.



**Abb. 49:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 4 Stunden Kultivierung: Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung.

**A:** Maschinerte, bestrahlte ( $O_2N_2$ ) Titanprobe. Pfeil: länglicher Aufbau der Gingivafibroblasten mit Zellfortsätzen.

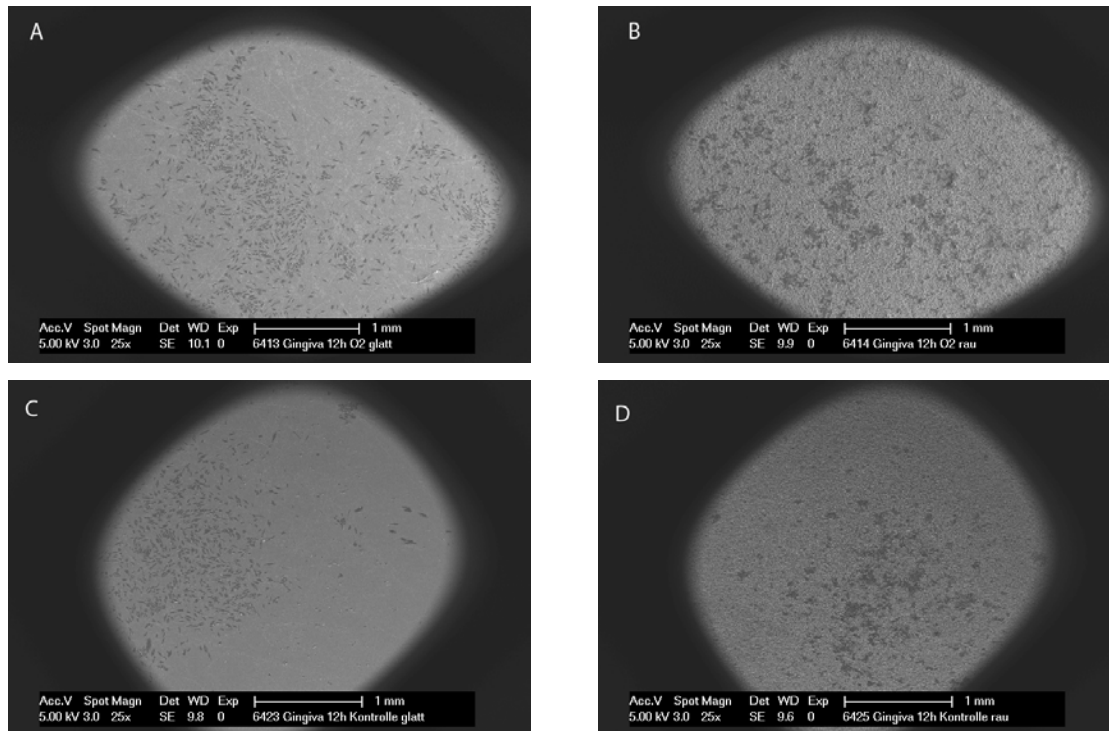
**B:** Maschinerte, ohne Zündung der Trägergase mitgeführte Titanprobe. Pfeil: rundlichere Konfiguration der Zellen, kaum Zellausläufer.

### *Kultivierung 12 Stunden*

#### **Rasterelektronenmikroskopie (Verteilung, Morphologie)**

Nach 12 Stunden zeigten sich alle Titanproben mit Gingivafibroblasten besiedelt. Dabei wiesen die maschinerten Oberflächen bei beiden Reaktivgaszusammensetzungen eine flächigere Besiedelung mit Gingivafibroblasten auf als die mikrostrukturierten Oberflächen (Abb. 50). Die Besiedelung der Kontrollproben stellte wie nach 4 Stunden eine Lokalisierung der Zellen am Ort der Applikation dar. Man konnte auf den maschinerten, mit Plasma behandelten Titanproben deutlich die Zellausläufer erkennen (Abb. 51). Die Zellen begannen miteinander in Kontakt zu treten (Abb. 52).





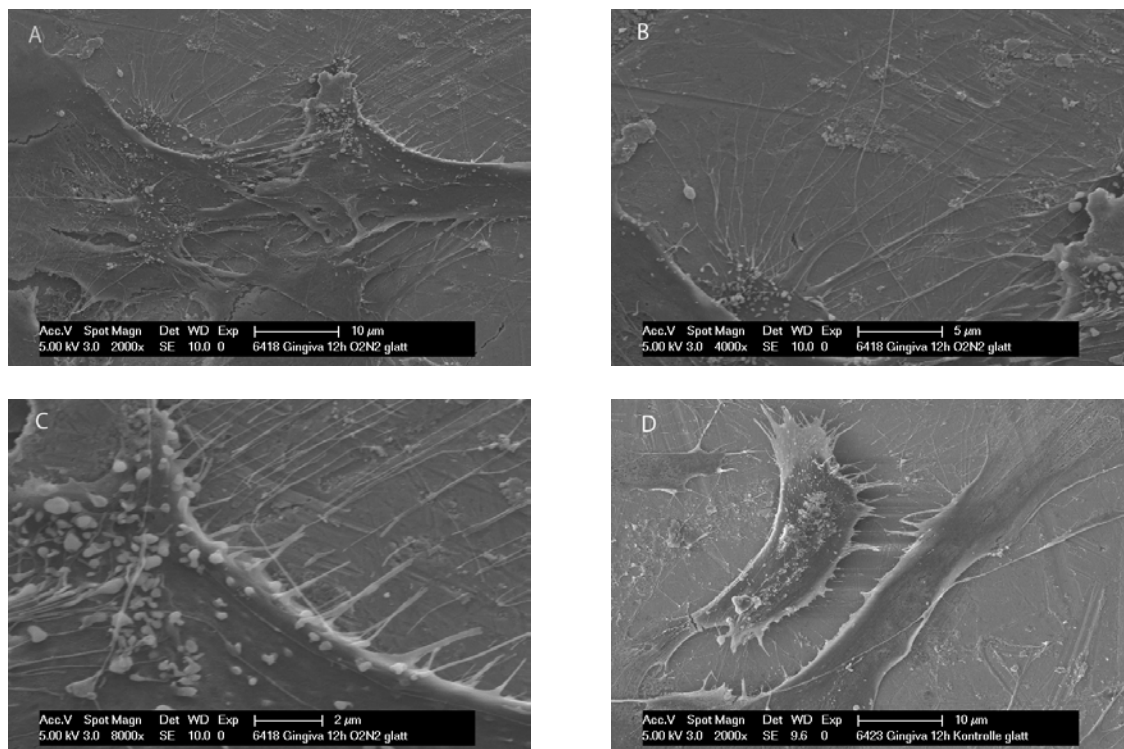
**Abb. 50:** Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach 12 Stunden Kultivierung.

**A:** Maschinerte, mit der Gasmischung  $O_2$  bestrahlte Titanprobe. Gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Titanoberfläche.

**B:** Mikrostrukturierte, bestrahlte Titanprobe (Gasmischung  $O_2$ ). Verteilung der Zellen auf der Titanoberfläche weniger dicht.

**C:** Maschinerte, unbestrahlte Titanprobe. Punktuelle Anordnung der Zellen am Applikationsort.

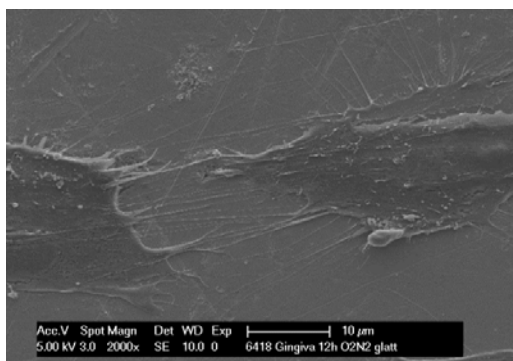
**D:** Mikrostrukturierte, unbestrahlte Titanprobe. Punktuelle Lokalisation der Zellen auf der Oberfläche.



**Abb. 51:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen maschinierter Titanoberflächen nach 12 Stunden Kultivierung.

A-C: Detailaufnahme der Zellausläufer in verschiedenen Vergrößerungen (mit Gasmischung  $O_2N_2$  bestrahlt; 2000x-8000x).

D: Detailaufnahme maschinierter, nicht bestrahlter Kontrolle mit kurzen Zellausläufern.

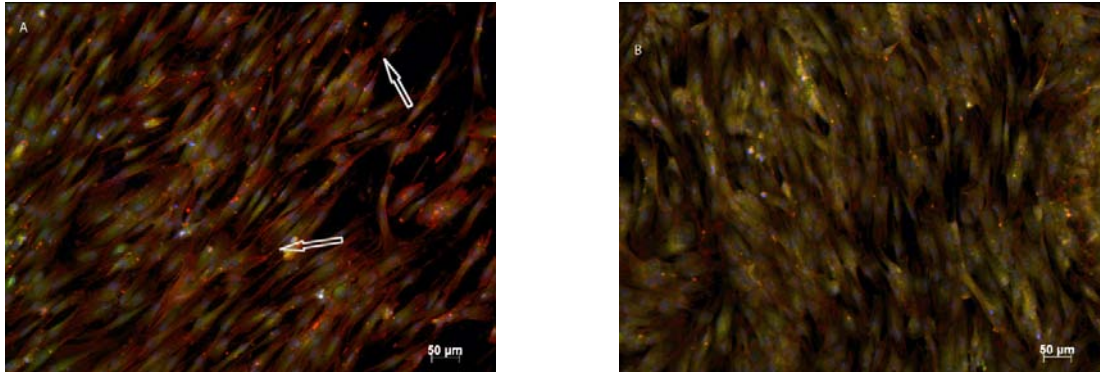


**Abb. 52:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mit Gasmischung  $O_2$  bestrahlten maschinierter Titanoberfläche nach 12 Stunden Kultivierung. Fibroblasten treten mit ihren Ausläufern in Kontakt.

### Fluoreszenzmikroskopie (Morphologie)

Die Morphologie der Zellen zeigte sich auf maschinierter Titan länglicher und flacher, während auf mikrostrukturiertem Titan die Zellen scheinbar in die Oberfläche hineinwuchsen (Abb. 53). Es war kein Unterschied zwischen den Gasparametern in Bezug auf die Morphologie erkennbar. Die Zellen schienen Kontakt zu den benachbarten Zellen zu suchen und sich auszubreiten. Auf maschinieren Oberflächen zeigten die Gingivafibroblasten einen längli-

chen Phänotyp, während sie auf den mikrostrukturierten Proben einen etwas rundlicheren Aufbau aufwiesen. Diese Unterschiede ließen sich auch auf den Proben, die mit den Reaktivgasen ohne Zündung des Plasmas bestrahlt wurden, erkennen.



**Abb. 53:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 12 Stunden Kultivierung: Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung.

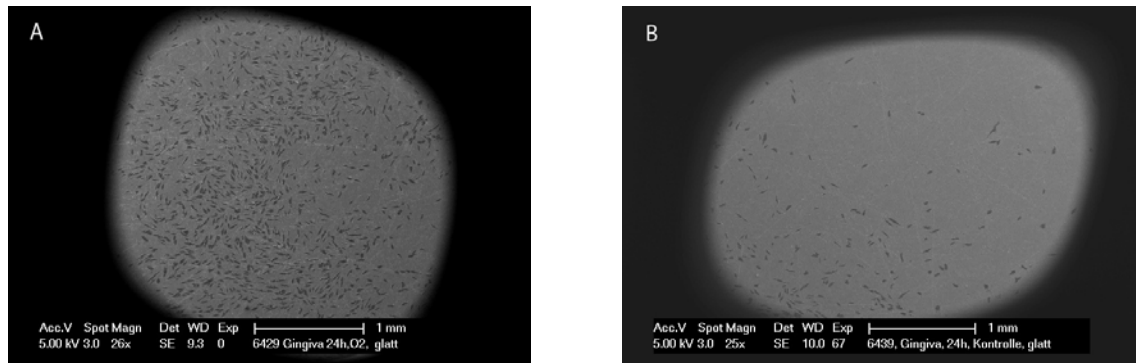
**A:** Maschinerte, bestrahlte ( $O_2N_2$ ) Titanprobe. Gingivafibroblasten mit länglichen Zellkörpern, die Kontakt zu den Nachbarzellen suchen.

**B:** Maschinerte, ohne Zündung der Trägergase mitgeführte Titanprobe mit kleineren Zellkörpern.

### *Kultivierung 24 Stunden*

#### **Rasterelektronenmikroskopie (Verteilung, Morphologie)**

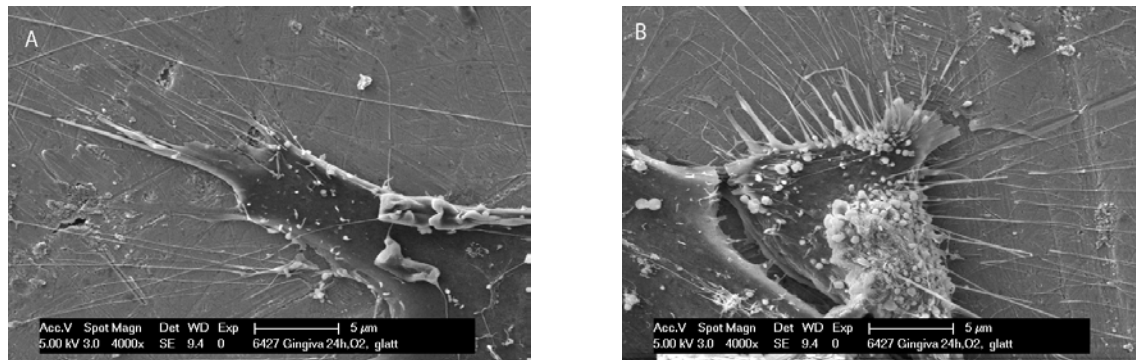
Nach 24 Stunden war keine Veränderung der mikrostrukturierten Oberfläche durch die Plasmastrahlung feststellbar. Nicht alle Probekörper wiesen eine Besiedelung mit Gingivafibroblasten auf, da die Zellen bereits wieder begannen sich abzulösen. Daher war eine Aussage bezüglich der Gasparameter und Oberflächenbeschaffenheiten nicht möglich. Es konnte jedoch ein morphologischer Unterschied zwischen den bestrahlten Prüfkörpern und den unbehandelten Kontrollen detektiert werden (Abb. 54). Die Fibroblasten differierten auf den bestrahlten Oberflächen im Vergleich zu den Kontrollen und es zeigte sich eine flächigere Besiedelung auf den bestrahlten Prüfkörpern. Die Zellen präsentierten auf den maschinerten Oberflächen eine längere Konfiguration und stärker ausgeprägte Zellfortsätze (Abb. 55, 56).



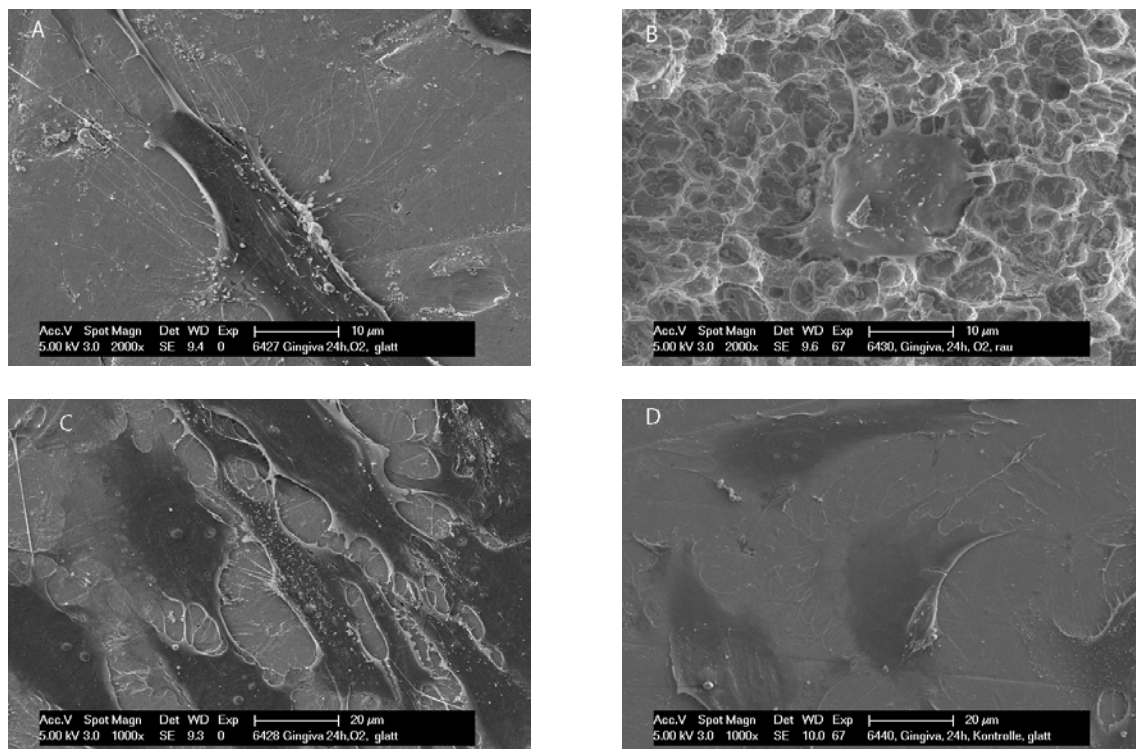
**Abb. 54:** Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen maschinierter Titanproben nach 24 Stunden Kultivierung.

**A:** Maschinierter, mit der Gasmischung  $O_2$  bestrahlte Titanprobe, gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Titanoberfläche.

**B:** Maschinierter, ohne Zündung der Trägergase mitgeführte Titanprobe. Verteilung der Zellen auf der Titanoberfläche weniger dicht und keine gleichmäßige Verteilung auf der Titanplatte.



**Abb. 55:** Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahmen einer von mit Gasmischung  $O_2$  bestrahlten maschinierter Titanprobe nach 24 Stunden Kultivierung. Ausgeprägte Zellausläufer und flache längliche Zellkonfiguration erkennbar.



**Abb. 56:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme bestrahlter Titanproben ( $O_2$ ) nach 24 Stunden Kultivierung.

**A:** Maschinerte Titanprobe mit ausgeprägten Zellausläufern und länglicher Zellkonfiguration.

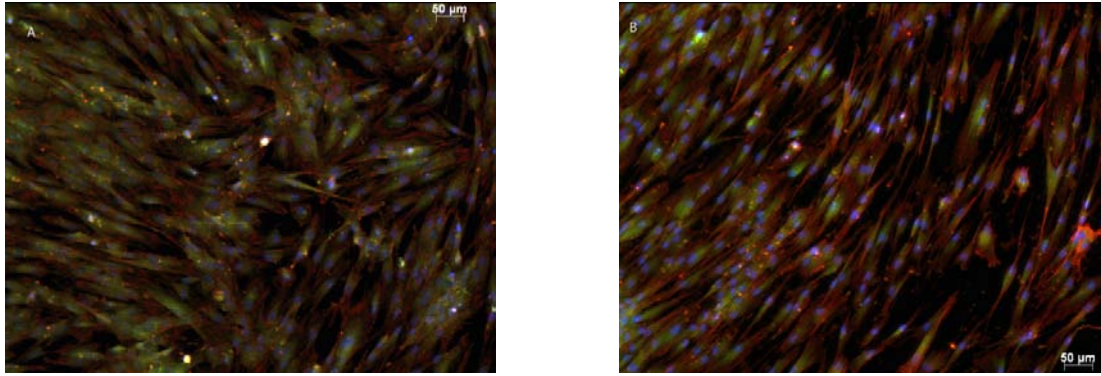
**B:** Mikrostrukturierte Oberfläche. Fibroblasten mit kurzen Zellfortsätzen und rundem Phänotyp.

**C:** Fibroblasten auf maschinierter Probe (1000x).

**D:** Mitgeführte maschinerte Kontrolle, ohne Zündung der Trägergase, mit runden Zellkörpern und kurzen Zellfortsätzen.

### Fluoreszenzmikroskopie (Morphologie)

Die Zellen wuchsen länglich und suchten mit ihren Ausläufern Kontakt zu benachbarten Zellen (Abb. 57). Auf mikrostrukturiertem Titan wuchsen die Zellen in die strukturierte Oberfläche mit ihren Ausläufern hinein. In Bezug auf die Morphologie und die Zellbedeckung zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gasparametern.



**Abb. 57:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 24 Stunden Kultivierung: Vinculin-, Phalloidin-, DAPI-Färbung.

**A:** Maschinierter, bestrahlter ( $O_2$ ) Titanprobe. Dichte Bedeckung mit Gingivafibroblasten, längliche Zellkörper, die zueinander Kontakt suchen. Zellkörper nahe aneinander gelagert.

**B:** Maschinierter, bestrahlter ( $O_2N_2$ ) Titanprobe. Ebenfalls gleichmäßige Bedeckung mit Gingivafibroblasten, Zellkörper nicht so dicht aneinander gelagert.

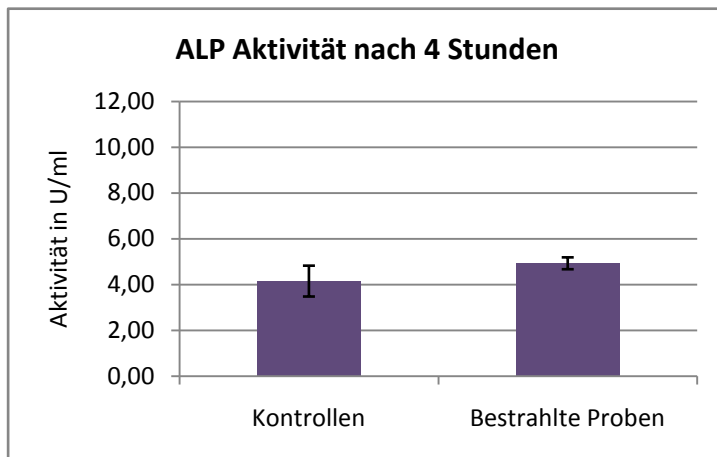
### 4.3 Biologische Aktivität

#### *Kultivierung 4 Stunden*

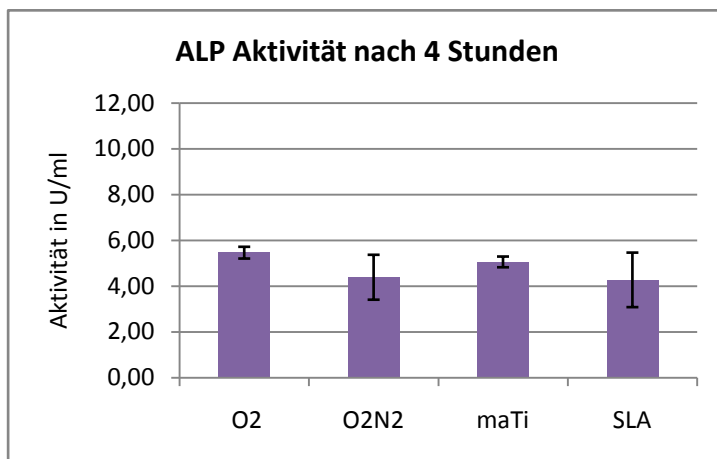
##### **Alkalische Phosphatase Auswertung (ALP)**

Die Ergebnisse nach 4 Stunden zeigten tendenziell höhere Werte für die mit Plasma behandelten Proben verglichen mit den mitgeführten Kontrollen ( $p = 0,0903$ , Abb. 58). Es konnten in Bezug auf Oberflächentextur und die Gasmischungen für die bestrahlten Proben keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

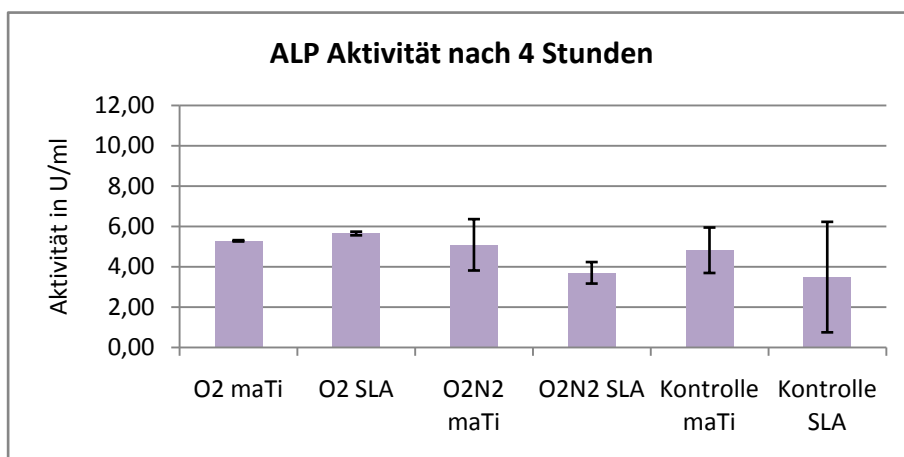
A)



B)



C)



**Abb. 58:** Übersicht über die ALP Aktivität nach 4 Stunden, Mittelwerte und Standardabweichung.

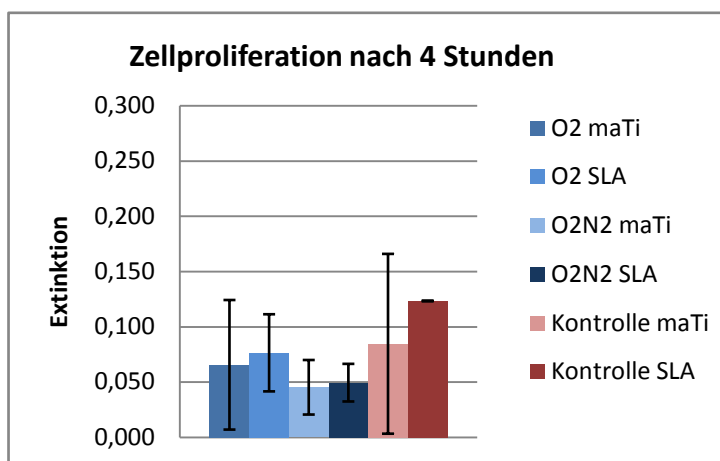
**A:** Vergleich bestrahlte Proben und mitgeführte Kontrollen.

**B:** Vergleich der bestrahlten Proben hinsichtlich Reaktivgasmischungen und der Oberflächenkonfiguration.

**C:** Vergleich aller Subgruppen.

### Zell Proliferation Reagenz WST-1

Nach 4 Stunden zeigten sich für die Mitochondrien Dehydrogenase Aktivität hinsichtlich Bestrahlung ( $p = 0,090$ ), Mikrostruktur ( $p = 0,699$ ) und Gaszusammensetzung ( $p = 0,150$ ) keine signifikanten Unterschiede (Abb. 59). Es waren allerdings sehr hohe Standardabweichungen bei diesen Experimenten zu verzeichnen. Eine Wiederholung der Versuche ergab ähnliche Ergebnisse.

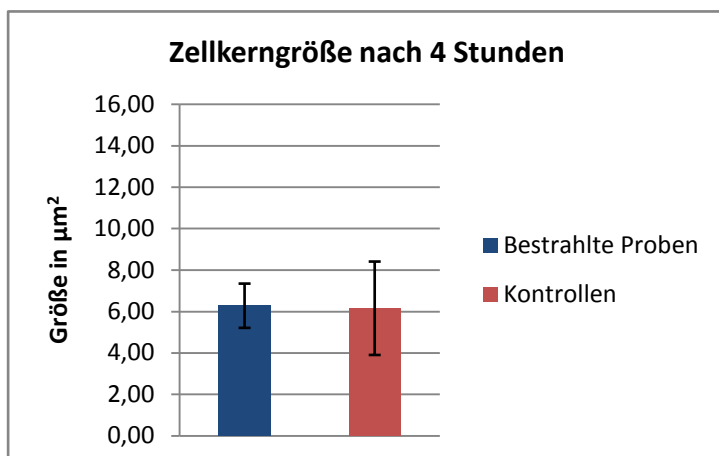


**Abb. 59:** Übersicht über WST-1 Mittelwerte und Standardabweichung nach 4 Stunden.

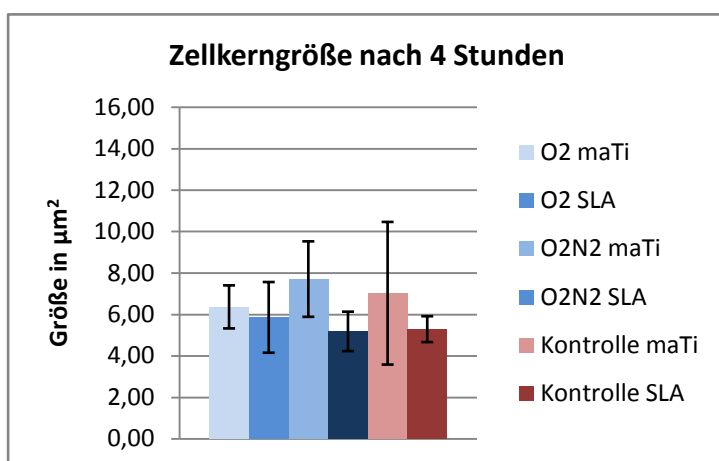
### Fluoreszenzmikroskopie / Zellkerngröße

Die Untersuchung der Zellkerngröße nach 4 Stunden ergab, dass die Zellkerne auf maschierten Titanoberflächen größer waren als auf mikrostrukturierten ( $p = 0,028$ ). Dies war unabhängig von den gewählten Gasparametern und der Bestrahlung. Die Zellkerne waren auf den bestrahlten Proben im Mittelwert größer (Abb. 60). Es zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben ( $p = 0,624$ ). Bezüglich der beiden Reaktivgasmischungen ließ sich kein Unterschied ( $p = 0,645$ ) feststellen (Abb. 61).





**Abb. 60:** Übersicht über Zellkerngröße nach 4 Stunden Kultivierung, Mittelwerte und Standardabweichung.



**Abb. 61:** Übersicht über Zellkerngröße nach 4 Stunden Kultivierung, Mittelwerte und Standardabweichung. Vergleich zwischen allen Versuchsdurchführungen nach 4 Stunden.

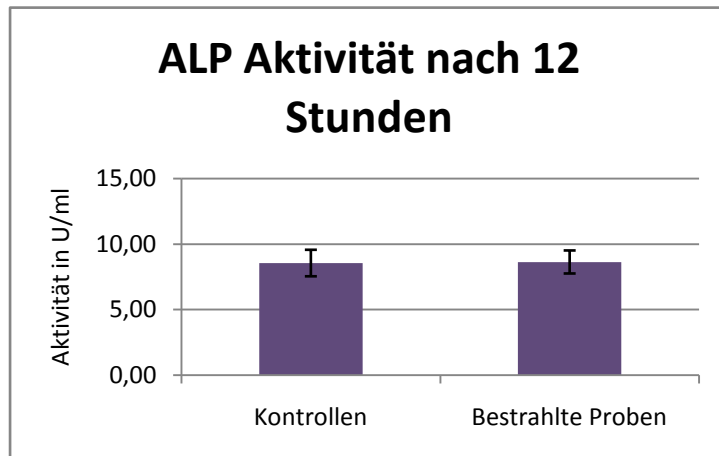
### *Kultivierung 12 Stunden*

#### **Alkalische Phosphatase Auswertung (ALP)**

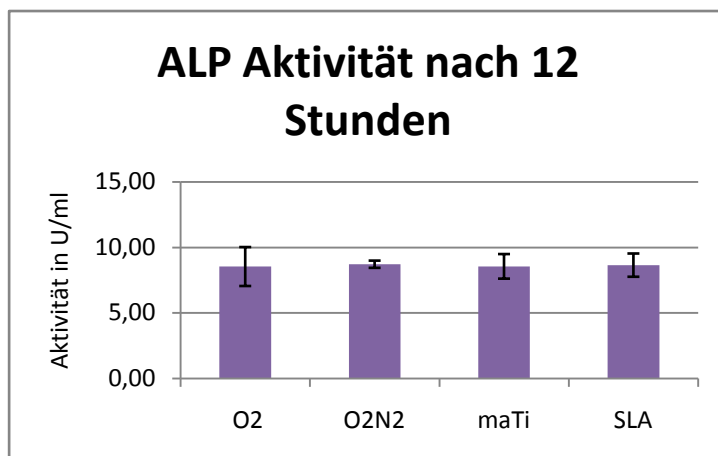
Betrachtet man die Ergebnisse nach 12 Stunden, so zeigten sich ähnliche Ergebnisse für die bestrahlten Proben, verglichen mit den unbestrahlten Kontrollen (Abb. 62). Es ließ sich kein Vorteil für eine Gasmischung erkennen (Abb. 63). Für die Oberflächenbeschaffenheiten ergaben sich keine unterschiedlichen Ergebnisse (Tabelle 11, Abb. 64).

**Tabelle 11:** ALP Auswertung - Signifikanz der Vergleiche

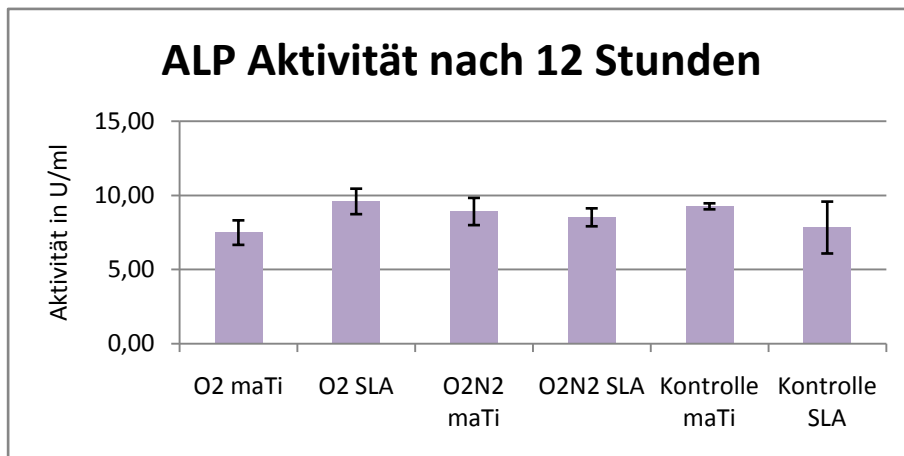
<b>Mann-Whitney-U-Test</b>	<b>12h</b>
<b>Bestrahlt &lt;-&gt; Kontrollen</b>	0.881
<b>Bestrahlt O<sub>2</sub> &lt;-&gt; bestrahlt O<sub>2</sub>N<sub>2</sub></b>	0.878
<b>Bestrahlt maTi &lt;-&gt; bestrahlt SLA</b>	0.887



**Abb. 62:** Übersicht über die ALP Aktivität nach 12 Stunden, Mittelwerte und Standardabweichung.



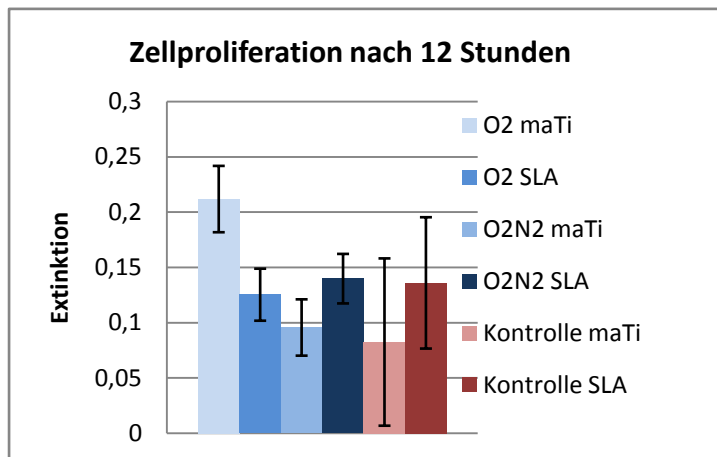
**Abb. 63:** Übersicht über die ALP Aktivität nach 12 Stunden, Mittelwerte und Standardabweichung. Vergleich der Reaktivgasmischungen und der Oberflächenkonfiguration.



**Abb. 64:** Übersicht über die ALP Aktivität nach 12 Stunden, Mittelwerte und Standardabweichung, Vergleich aller Subgruppen.

### Zell Proliferation Reagenz WST-1

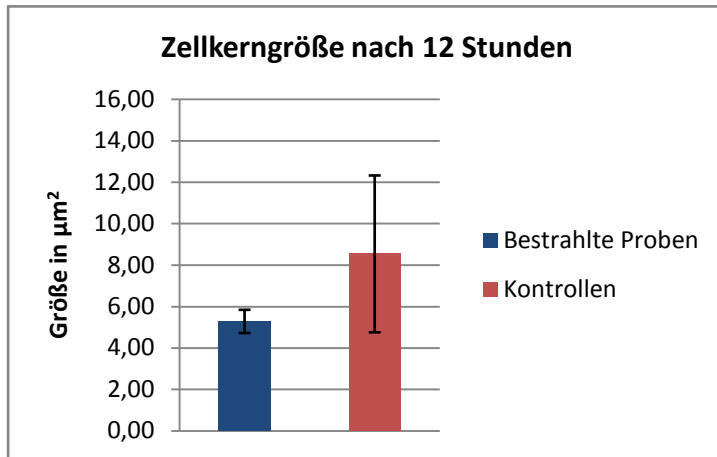
Nach 12 Stunden zeigte sich für die Mitochondrien Dehydrogenase Aktivität hinsichtlich Bestrahlung ( $p = 0,332$ ), Mikrostruktur ( $p = 0,818$ ) und Gaszusammensetzung ( $p = 0,150$ ) keine signifikanten Unterschiede (Abb. 65). Es waren ebenfalls hohe Standardabweichungen bei diesen Experimenten zu verzeichnen.



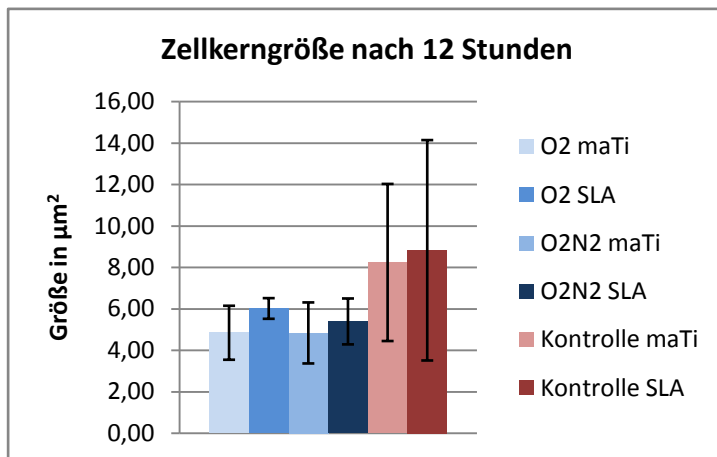
**Abb. 65:** Übersicht über WST-1 Mittelwerte und Standardabweichung nach 12 Stunden.

### Fluoreszenzmikroskopie / Zellkerngröße

Nach 12 Stunden zeigte sich bei der Auswertung der Zellkerngröße hinsichtlich Bestrahlung ( $p = 0,172$ ), Mikrostruktur ( $p = 0,195$ ) und Gaszusammensetzung ( $p = 0,645$ ) keine Unterschiede (Abb. 66, Abb. 67).



**Abb. 66:** Übersicht über Zellkerngröße nach 12 Stunden Kultivierung, Mittelwerte und Standardabweichung. Vergleich zwischen bestrahlten Proben und mitgeführten Kontrollen.

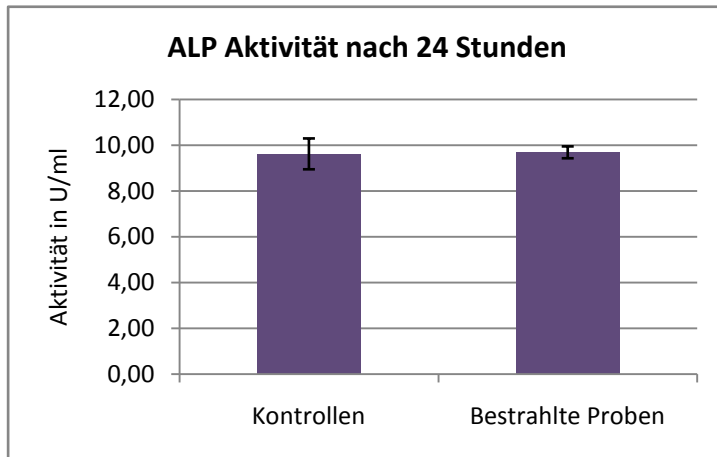


**Abb. 67:** Übersicht über Zellkerngröße nach 12 Stunden Kultivierung, Mittelwerte und Standardabweichung.

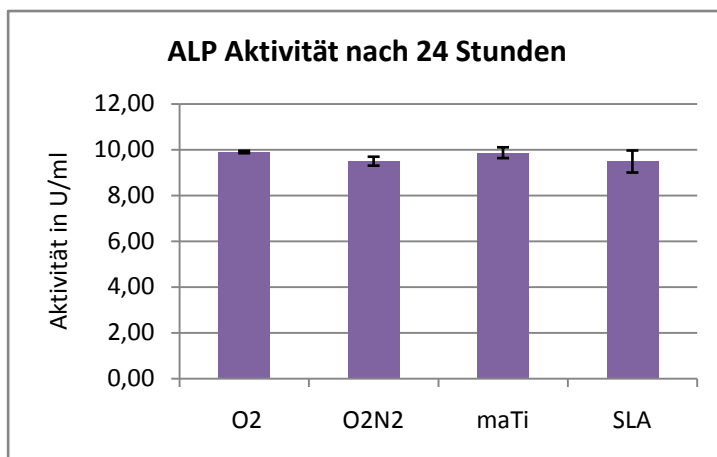
### Kultivierung 24 Stunden

#### Alkalische Phosphatase Auswertung (ALP)

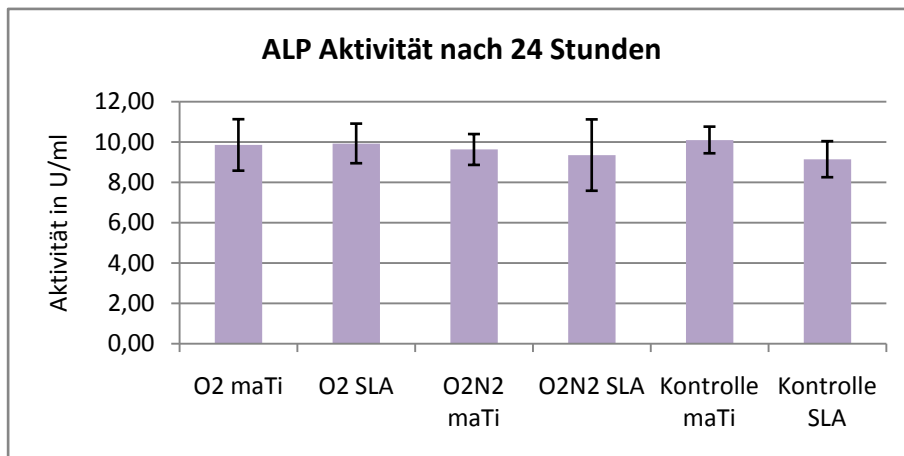
Nach 24 Stunden zeigten sich für die ALP keine Unterschiede zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Proben ( $p = 0,928$ ), hinsichtlich Oberflächenstruktur ( $p = 0,798$ ) und Gaszusammensetzung ( $p = 0,572$ , Abb. 68, 69, 70).



**Abb. 68:** Übersicht über die ALP Aktivität nach 24 Stunden, Mittelwerte und Standardabweichung.



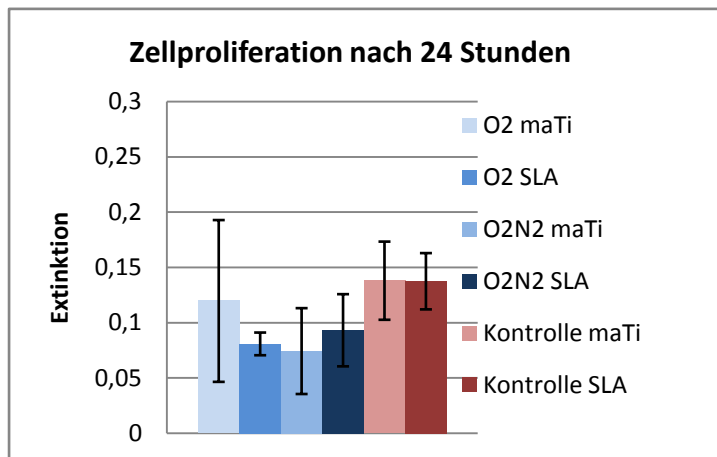
**Abb. 69:** Übersicht über die ALP Aktivität nach 24 Stunden, Mittelwerte und Standardabweichung. Vergleich der Reaktivgasmischungen und der Oberflächenkonfiguration.



**Abb. 70:** Übersicht über die ALP Aktivität nach 24 Stunden, Mittelwerte und Standardabweichung. Vergleich aller Subgruppen.

### Zell Proliferation Reagenz WST-1

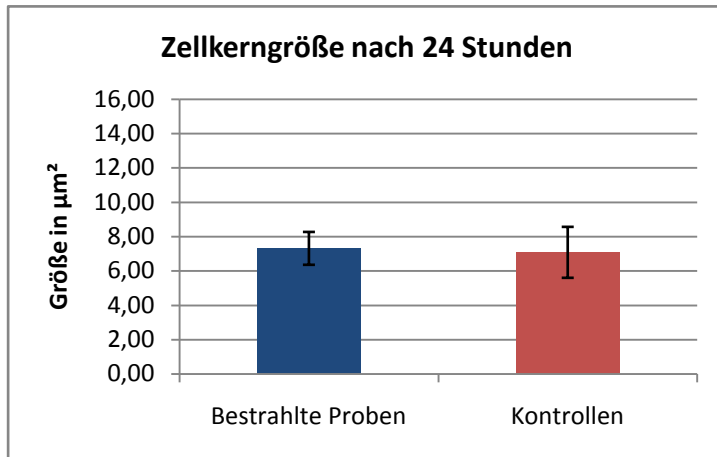
Der Vergleich zwischen den bestrahlten Proben und den Kontrollen zeigte signifikante Unterschiede zugunsten der unbestrahlten Kontrollen ( $p = 0,029$ ). Hinsichtlich Gaszusammensetzung ( $p = 0,749$ ) und Oberflächenstruktur ( $p = 0,818$ ) ergaben sich keine Unterschiede (Abb. 71).



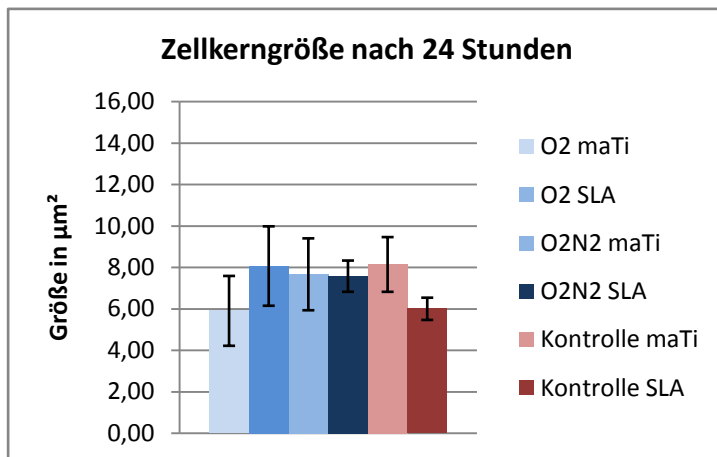
**Abb. 71:** Übersicht über WST-1 Mittelwerte und Standardabweichung nach 24 Stunden.

## Fluoreszenzmikroskopie / Zellkerngröße

Nach 24 Stunden zeigten sich bei der Auswertung der Zellkerngröße hinsichtlich Bestrahlung ( $p = 0,971$ ), Mikrostruktur ( $p = 0,279$ ) und Gaszusammensetzung ( $p = 0,328$ ) keine Unterschiede (Abb. 72, Abb. 73).



**Abb. 72:** Übersicht über Zellkerngröße nach 24 Stunden Kultivierung, Mittelwerte und Standardabweichung.



**Abb. 73:** Übersicht über Zellkerngröße nach 24 Stunden Kultivierung, Mittelwerte und Standardabweichung. Vergleich zwischen allen Subgruppen nach 24 Stunden.

## 5 Diskussion

Die während dieser Studie durchgeführten Untersuchungen befassten sich mit dem Einfluss kalten atmosphärischen Plasmas auf das initiale Attachmentverhalten von primären humanen Gingivafibroblasten. Dabei wurde die Besiedelung von zuvor konditionierten maschinieren und mikrostrukturierten Titanproben und den mitgeführten Kontrollproben, die ohne Zündung der Trägergase behandelt wurden, durch Gingivafibroblasten untersucht. In bisher veröffentlichten Studien konnte der fördernde Einfluss der Plasmabehandlung auf die Benetzbarkeit von Oberflächen und auf das Zellwachstum nachgewiesen werden (Duske *et al.*, 2012). Allerdings wurden in diesen immortalisierte Osteoblasten als Zellpopulationen herangezogen. In der hier vorliegenden *In-vitro*-Studie wurden erstmals primäre humane Gingivafibroblasten untersucht. Die Abdichtung des Implantates mittels periimplantärer Gingiva ist für einen langfristigen und erfolgreichen Implantaterhalt unabdingbar (Chung *et al.*, 2006). Die Adhäsion von Gingivafibroblasten spielt im Rahmen der Einheilung von Implantaten als Schutz vor Infektionen eine besondere Rolle (Kawahara *et al.*, 1998, Schlegel *et al.*, 1994).

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Bestrahlung von maschinieren und mikrostrukturierten Titanoberflächen mit kaltem atmosphärischem Plasma zu einer homogenen Zelladhäsion von Gingivafibroblasten führt. Die Oberfläche der Titanprüfkörper wurde dabei nicht verändert und es wurden biologisch akzeptable Temperaturen bei der Plasmabestrahlung gewählt. Die Titanoberfläche zeigte eine höhere Benetzbarkeit, die zu einer Verbesserung der Zelladhäsion und Zelldifferenzierung führen kann. Dies wird als Vorteil für die Re-Osseointegration von Titanimplantaten diskutiert (Yoshinari *et al.*, 2009; Lopez-Heredia *et al.*, 2008). Es stellt sich nun die Frage, ob dies auch zu einer Verbesserung der Anlagerung primärer humaner Gingivafibroblasten führt und die Zelldifferenzierung dieser fördern kann.

Um die Studie durchführen zu können, wurden in Grundlagenuntersuchungen die Idealbedingungen für den Versuchsaufbau ermittelt. Diese wurden im Rahmen einer Arbeitsgruppe mit Mitgliedern des Leibniz-Institutes für Oberflächenmodifizierung (IOM) e.V. Leipzig, des Fraunhofer-Institutes für Zelltherapie und Immunologie (IZI) Leipzig und dem Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde durchgeführt.



## 5.1 Grundlagenuntersuchungen der Arbeitsgruppe

Im Rahmen von Vorversuchen wurden verschiedene Versuchsaufbauten geprüft und die Versuchsabläufe optimiert. Dazu wurden insgesamt 1132 Versuche mit 380 Titanprüfkörpern durchgeführt. Zunächst wurde die Reaktivgaszusammensetzung modifiziert. Dabei kamen bei ersten Versuchen die Gase Helium und Sauerstoff zum Einsatz. Die mittlere Leistung der Plasmaquelle wurde mit 5 Watt gewählt. Der Gasfluss für Helium betrug 2000 sccm, bei der zweiten Gasmischung wurden 2000 sccm Helium und 5 sccm Sauerstoff gewählt. Die Kultivierungsdauer belief sich auf 24 Stunden.

In folgenden Versuchen wurde die Gaszusammensetzung zunächst um das Gas Stickstoff erweitert. Dafür wurde den Gasmischungen die Mischung 2000 sccm Helium und 1600 sccm Stickstoff beigefügt. Später erfolgte eine Erweiterung der Gaszusammensetzungen um eine Sauerstoff/Stickstoff Gasmischung ( $O_2N_2$ : 2000 sccm Helium, 10 sccm Sauerstoff, 250 sccm Stickstoff). Es zeigten sich Unterschiede in der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung zwischen den einzelnen Gasen. So zeigten Sauerstoff ( $O_2$ : 2000 sccm Helium, 5 sccm Sauerstoff) und das Gasgemisch Sauerstoff/Stickstoff ( $O_2N_2$ : 2000 sccm Helium, 10 sccm Sauerstoff, 250 sccm Stickstoff) die besten Ergebnisse, bezogen auf das Zellwachstum und die Oberflächenbenetzbarkeit. Daher wurden sie für die endgültige Versuchsreihe gewählt.

Die Auswirkung verschiedener Kultivierungszeiten wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht. Dabei wurden zunächst Zeiten von 4, 12, 24, 48, 120 Stunden sowie 6, 7 und 14 Tage miteinander verglichen. Auch hier zeigten sich Unterschiede zwischen den Zeitparametern. Die Auswertung der Zellanzahl sowie die genaue Untersuchung einzelner Zellen bei einer Kultivierungsdauer von 120 Stunden und 6, bzw. 14 Tagen waren aufgrund der Kontaminationsgefahr nicht möglich, da kein Antibiotikum dem Medium zugefügt wurde. Zusätzlich stellte sich die Besiedelung der Titanplatten als zu stark heraus und die mehrlagigen Zellkulturen lösten sich von der Oberfläche ab.

Schließlich wurde die definitive Kultivierungszeit für den Versuchsaufbau von 12, 24 und 48 Stunden auf 4, 12 und 24 Stunden reduziert, um eine Untersuchung des initialen Zellattachments zu ermöglichen.

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden die genutzten Titanprüfkörper nach der Durchführung der Versuche wiederverwendet. Die Aufbereitung sah eine Lagerung der Probekörper in 70%igem Alkohol, einer Waschung der Prüfkörper mittels Enzymax®-Lösung (Hu-Friedy) und einer Sterilisierung im Autoklav in *Aqua dest.* vor. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen

werden, dass eine rückstandsfreie Reinigung gegeben war. Zusätzlich stellte sich die Frage, ob die Reinigungslösung Einfluss auf die Oberflächenkonfiguration der Titanprüfkörper nahm. Reinigungslösungen beinhalten ätzende Phosphorsäureester, die eine Beschädigung der Titanoberfläche und somit eine ungewünschte Mikrostrukturierung der maschinerten Oberflächen bewirken können. Das von uns genutzte Reinigungsmittel Enzymax® ist eine phosphatfreie Spüllösung auf Enzymbasis (Enzymgruppe: Subtilisin). So wurde versucht das Risiko der ungewünschten Veränderung der Titanoberfläche zu minimieren. Schließlich stellte sich die Frage, ob eine lose Reinigung der Prüfkörper in der Spülmaschine nicht zu einer Beschädigung und Zerstörung der intakten Titanoberfläche führt. Daher wurde auf weitere Versuchsreihen mit recycelten Probekörpern verzichtet.

Weitere Versuche erfolgten, um die Vorbehandlung der Titanprüfkörper zu optimieren. Dazu wurden die zuvor in *Aqua dest.* autoklavierten Titanplatten mit unterschiedlichen Medien beschichtet. Es kam die einmalige Applikation von Gelatine, PBS und DMEM-Flüssigmedium im Vergleich zu einer mehrmaligen Benetzung der bestrahlten Probekörper zum Einsatz. Nach Bestrahlung wurden die Zellen aufgebracht und über den Zeitraum der Adhärenz feucht gehalten. Nach 30 bis 45 Minuten erfolgte die Auffüllung der Kavitäten mit 200 µl Vollmedium. Die Kultivierungszeit betrug 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Phalloidin- und DAPI-Färbung. Es zeigte sich bei der 30minütigen Adhärenzbehandlung durch permanente Befeuchtung mit Medium eine bessere Besiedelung der Oberflächen im Vergleich zu den anderen Reagenzien. Gleichzeitig hatten die Zellen bereits Kontakt mit der Oberfläche aufgenommen und wurden bei der Zugabe des Kulturmediums nicht abgeschwemmt. Es stellten sich große Unterschiede zwischen maschinerten und mikrostrukturierten Oberflächen dar. Mikrostrukturierte Oberflächen benötigten einen deutlich erhöhten Aufwand zur Etablierung der Zellkultur.

Anschließende Untersuchungen bezogen sich auf die Variation der Bestrahlungsparameter. Dafür wurden sowohl die Pulsleistung (zwischen 250 und 300 Watt) als auch die Pulslänge (zwischen 3-5 µs) und die Geschwindigkeit der geführten Bewegung des Plasmajets über der Probe (5-16 mm/s) überprüft. Es zeigten sich die besten Ergebnisse bei einem Arbeitsabstand von 2 mm, einer Pulslänge von 5 µs und einer Pulsleistung von 300 Watt. Die mittlere Mikrowellenleistung wurde mit 5 Watt, der Gasfluss wurde auf 2 Liter Helium pro Minute und die Geschwindigkeit mit 8 mm/s festgelegt. Die Bestrahlungsparameter wurden so gewählt, dass sie in der zahnmedizinischen Praxis angewandt werden können und biologisch akzeptable Temperaturen im Bereich des Bestrahlungsfeldes erreicht werden.

## 5.2 Versuchsmodell und Durchführung

Um die initiale Besiedelung von Gingivafibroblasten zu untersuchen, wurde ein Modellsystem gewählt. So wurden als Zellen primäre humane Gingivafibroblasten genutzt, da sich primäre Zellen bereits durch eine hohe Differenzierung und eine empfindlichere Kultur auszeichnen, jedoch die natürlichen Verhältnisse besser abbilden als immortalisierte Zellen. Die genutzten Zellen befanden sich in der sechsten Passage. Die eingesetzten Probekörper bestanden aus medizinischem Reintitan (Titan Grade 2) mit unterschiedlicher Oberflächenkonfiguration. Um dem Aufbau gängiger Implantate gerecht zu werden, die einen polierten und einen mikrostrukturierten Anteil aufweisen, wurden sowohl mikrostrukturierte Oberflächen, die sandgestrahlt und geätzt waren, als auch maschinerte Titanproben für die Versuchsdurchführung genutzt. Die Bestrahlung erfolgte mit Hilfe einer miniaturisierten Plasmaquelle, durch die ein hindurchfließender Gasstrom per gepulster Mikrowelle (2,45 GHz) angeregt wurde. Die Untersuchung fand unter konstanten Labor-Umgebungsbedingungen statt. Durch Veränderung der Bestrahlungsparameter kann die Behandlungszeit beeinflusst und weiter verkürzt werden (Ritts *et al.*, 2010). Die Applikation der Zellen erfolgte an einer Sicherheitswerkbank, um eine Kontamination der Proben zu verhindern. Die besiedelten Titanprobekörper wurden unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Nährmedium wurde DMEM-Flüssigmedium gewählt, dem 10% fetales Kälberserum zugesetzt wurde. Die Kultivierungsdauer wurde auf 4, 12 und 24 Stunden festgesetzt, da auf eine prophylaktische Antibiotikazugabe zu dem Medium verzichtet wurde.

## 5.3 Analyse der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden durch Rasterelektronen- und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert und mittels enzymatischer Tests belegt. Durch die Ergebnisse werden vorliegende Daten zu Zelladhäsion und Wachstum von Zellen auf bestrahlten Oberflächen bestätigt (Duske *et al.*, 2012; Yoshinari *et al.*, 2009).

Für die Auswertung des initialen Attachments wurde die Vinculin Färbung herangezogen. Diese wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Vinculin ist ein Fokaladhäsionsprotein. Fokalkontakte sind Zellverbindungsstellen, die sich an der Zellmembran befinden. Sie sind spezialisierte Bereiche auf der Zelloberfläche, durch die eine Zelle Kontakt zu ihrem Substrat hat. Der Bereich des Fokalkontaktes auf der Innenseite der Zellmembran steht in Verbindung mit dem Zytoskelett, während die Außenseite Kontakt mit der extrazellulären Matrix hat (Tint *et al.*, 1987). Fokalkontakte bestehen aus vielen verschiedenen Proteinen. Dabei entsteht der Kontakt zu den Proteinen der extrazellulären Matrix durch sogenannte transmembrane Integ-

rine. Sie bilden die zentrale Stelle, an der das intrazelluläre Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix in Verbindung steht (van der Flier *et al.*, 2001). Vor allem das Fokaladhäsionsprotein Vinculin spielt eine wichtige Rolle bei der Bestimmung des Adhäsionsverhaltens von Zellen auf Oberflächen. Vinculin ist ein Hauptstrukturprotein und verbindet das Zytoskelett mit Integrinen. Es ist ein Bestandteil von Adherens Junctions, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen und bindet verschiedene Proteine. Vinculin besitzt zahlreiche Bindungsstellen für Proteine, z.B. Talin, Catenine, Aktin oder Paxillin. Seine Hauptaufgabe innerhalb der Fokalkontakte ist eher regulierender als struktureller Natur (Critchley, 2000). Die Vinculin Färbung ermöglicht es, die Bildung fokaler Adhäsionsstellen zu zeigen.

Weitere Auswertungen bezüglich des initialen Attachments erfolgten rasterelektronen- und fluoreszenzmikroskopisch. Für die Analyse der rasterelektronenmikroskopischen Bilder wurden die Übersichtsaufnahmen herangezogen. Durch die Bestimmung der Zellbedeckung konnten die Besiedelung und das Attachment bestimmt werden. Allerdings ergaben sich bei dieser Untersuchung Fehlerquellen, die es zu berücksichtigen galt. So ließen sich die konfluenten Zellteppiche auf den Probekörperoberflächen nicht immer stabil fixieren. Es bestand die Gefahr, dass sich diese während der Fixierung lösten und danach bei der Spülung mittels Phosphat buffered saline (PBS) von der Oberfläche entfernt wurden. So wies die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung größere Fehlerquellen auf im Vergleich zu der fluoreszenzmikroskopischen.

In der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung kamen weitere Färbungen zum Einsatz. Die Färbung mittels Phalloidin kann zur Darstellung des Zytoskeletts genutzt werden. Phalloidin gehört zu der Gruppe der Phallotoxine und wird aus dem grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) isoliert. Es bindet irreversibel an die Verbindungsstellen der Untereinheiten des F-Aktin. Dabei ist das Phalloidin mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Rhodamin) markiert. Rhodamin hat eine Quantenausbeute nahe 100%. Das bedeutet, dass von 100 absorbierten Photonen nahezu alle in Fluoreszenzphotonen umgewandelt werden. Durch Anregung mit ultravioletterem Licht erhält man eine rote Darstellung des F-Aktins im Zytoskelett. Das Absorptionsmaximum liegt bei 556 nm und das Emissionsmaximum bei 573 nm. F-Aktin ist der Hauptbestandteil der Mikrofilamente, die Bestandteile des Zytoskeletts neben Mikrotubuli und Intermediärfilamenten sind. Dieses ist verantwortlich für die Strukturierung der Zelle und ermöglicht deren Bewegung, sowohl die Fortbewegung als auch die Bewegung von Zellkompartimenten. Zellen, die an Oberflächen adhären, verändern ihre Morphologie. Die Bestrahlung einer Oberfläche mittels Plasmajet vergrößert deren Benetzbarkeit. Dadurch verteilen sich Zellen verstärkt über die Oberfläche und flachen ab. Dies lässt sich mit Hilfe der Phalloi-

dinfärbung belegen. Die Spannung, der sich die Zellen dabei aussetzen lässt sich aufzeigen: Es bilden sich ausgehend von den Anheftungspunkten der Zellen („focal adhesion plaques“) charakteristische zytoskelettale Elemente, die sogenannten „stress fibers“ aus den Aktin-Monomeren. Phalloidin eignet sich gut für Mehrfachfärbungen.

4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von DNA in Zellen genutzt wird. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die DAPI Färbung zur Darstellung von Zellkernen zu nutzen. DAPI bindet in die AT-reichen kleinen Furchen doppelsträngiger DNA (Tanious *et al.*, 1992). Durch Anregung mit ultraviolettem Licht entwickelt DAPI im sichtbaren Bereich eine blaue Farbe. Die Fluoreszenz wird durch die Bindung an DNA um etwa 20% verstärkt. Dabei liegt das Absorptionsmaximum bei 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm. Durch die Emittierung blauen Lichtes am sogenannten Ende des Spektrums ist die DAPI Färbung mit anderen Färbemethoden, z.B. Phalloidin- oder Vinculin-Färbung, möglich.

Die Analysen bezüglich der biologischen Aktivität wurden ergänzend zu den Attachment Untersuchungen durchgeführt. Dazu erfolgte die Bestimmung der enzymatischen Aktivität (ALP) und der Zellproliferation. Die alkalische Phosphatase (ALP) ist ein membrangebundenes (Dowben, 1969), ubiquitär vorkommendes Plasmaenzym. Dabei umfasst die Bezeichnung alkalische Phosphatase mehrere Phosphatasen. Sie katalysiert die Hydrolyse von Phosphorsäure-Estern. Genau genommen spaltet sie dabei die Phosphatreste von phosphoryliertem Serin, Threonin und Tyrosin ab. Ihr Aktivitäts-Optimum liegt im alkalischen pH-Bereich. Es liegen im Körper mindestens drei Isoformen der alkalischen Phosphatase vor. Es existieren gewebespezifische Formen, z.B. des Interstitiums und der Plazenta, sowie unspezifische Formen, die in Leber, Knochen und Niere vorkommen (Weiss *et al.*, 1988). Die gewebeunspezifische alkalische Phosphatase findet sich zusätzlich in oralen Geweben wie der Pulpa und dem Parodont (Santos *et al.*, 2010). Sie wird von verschiedenen Zellen unterschiedlich stark exprimiert, unter anderem von Osteoblasten und osteoblastenähnliche Zellen (Sanikop *et al.*, 2012). Daher ist die alkalische Phosphatase ein Marker für osteoinduktive Zellen (Ito *et al.*, 1995).

Der Nachweis der Zellproliferation erfolgte über das Zell-Proliferation-Reagenz WST-1. Für die Bestimmung der Zellproliferation existieren unterschiedliche Standardassays in denen der Einbau von radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die DNA stattfindet oder alternativ der Einbau des nicht radioaktiven Thyminanalogon 5-Brom-2'-Desoxyuridin in der S-Phase des Zellzyklus. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Extinktion des von den Zellen metaboli-

sierten WST-1 in einem ELISA Reader zu messen. Dabei wird die Zellproliferation anhand der mitochondrialen Dehydrogenase Aktivität bestimmt. Diese spaltet das Tetrazolium Salz WST-1 (leicht rötlich) zu Formazan (dunkelrot) (Berridge *et al.*, 2005). So geht eine erhöhte Zellproliferation mit einer vermehrten Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase einher und bewirkt eine zunehmende Färbung durch eine verstärkte Umsetzung von Formazan. Dabei korrelieren die Färbung und damit die Umsetzung zu Formazan direkt mit der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen. Die Färbung und deren Lichtabsorption werden spektrophotometrisch mittels eines ELISA Readers gemessen, indem der Absorptionsgrad bei einer bestimmten Wellenlänge bestimmt wird. Diese liegt zwischen 420 nm und 480 nm.

#### 5.4 Kritische Betrachtung der Ergebnisse

Es zeigte sich bei fast allen Proben eine Besiedelung der Titanoberfläche mit Gingivafibroblasten. Dies war unabhängig davon, ob eine Bestrahlung mittels Zündung der Trägergase stattgefunden hat oder nicht. Bei Betrachtung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ließ sich erkennen, dass die Fibroblasten auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen in deren Struktur einwuchsen. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Studien (Aita *et al.*, 2009; Ogawa *et al.*, 2002). Es belegt die Biokompatibilität von Titan (Vörös *et al.*, 2001). Dies beschreibt die Verträglichkeit eines Werkstoffes in Bezug auf biologische Systeme (Wintermantel *et al.*, 2009).

Die Interaktion zwischen Zellen und der Oberfläche spielt eine bedeutende Rolle in der erfolgreichen Implantattherapie. So zeigen unterschiedliche chemische und physikalische Oberflächenmodifikationen einen Einfluss auf den Erfolg der Implantateinheilung. Mehrere Studien beschreiben den fördernden Einfluss der Oberflächenrauheit von Implantaten auf die Zellaktivität (Schwartz *et al.*, 2005). Zusätzlich spielt die Oberflächenbeschaffenheit von Titan eine bedeutende Rolle im Rahmen der Proteinexpression von Gingivafibroblasten und beeinflusst somit ihr Attachmentverhalten (Oates *et al.*, 2005). Die Ergebnisse der Studie zeigten eine signifikant höhere Benetzbarkeit und eine homogene Besiedelung der Titanoberflächen nach Bestrahlung mit kaltem atmosphärischem Plasma, unabhängig von der Reaktivgaszusammensetzung und der Oberflächenbeschaffenheit. Dies bestätigt frühere Studien (Duske *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2009), die mit immortalisierten Osteoblasten durchgeführt wurden. Die Gingivafibroblasten zeigten auf den plasmabestrahlten mikrostrukturierten Titanflächen zusätzlich ein Wachstum in die Tiefe der Oberflächentextur, während sie auf den unbehandelten Kontrollen lediglich an der Außenseite der Rillen und Mikrostrukturen wuchsen. Dies konnte auf den rasterelektronenmikroskopischen Bildern belegt werden. Die Orientie-

rung der Zellen äußerte sich auf den maschinieren Oberflächen aneinander ausgerichtet, während sich auf mikrostrukturierten eine zufällige Anordnung darstellte. Dies bekräftigt die Ergebnisse einer Studie von Yamano *et al.* (2011).

Die Resultate dieser Studie zeigen, dass die Bestrahlung von Reintitanoberflächen mit kaltem atmosphärischem Plasma die Homogenität der Zelladhäsion von Gingivafibroblasten verbessert. Dies bestätigte sich bei allen Untersuchungen. Lediglich die Betrachtung der Ergebnisse bezüglich der Zellproliferation (WST-1) bewies keinen eindeutigen Vorteil für die Plasmabehandlung. Allerdings konnte hier auch kein eindeutiger zytotoxischer Effekt aufgefunden werden. Die Ergebnisse entsprechen publizierten Daten für Fibroblasten der Maus (Matthes *et al.*, 2013). In anderen Studien wurde für immortalisierte Osteoblasten jedoch verbesserte Werte für die Proliferation gefunden (Duske *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2008), die jedoch als Plasmaquelle Argon Plasma gewählt hatten. Faktor für die fehlende Proliferationsförderung trotz homogener Verteilung kann ein erhöhter Stress für die Zellen aufgrund der hohen Oberflächenbenetzbarkeit des Titans sein. Auch die Nutzung des Edelgases Helium als Trägergas für die Plasmaquelle sollte weiter im Vergleich mit Alternativen untersucht werden. Ebenso muss die Modifizierung der Oxidschicht auf der Titanoberfläche und deren Einfluss auf die Proteininteraktion berücksichtigt werden. Die Untersuchung der Wirkungsweise von Atmosphärendruckplasmen auf Zellen ist momentan Gegenstand der plasmamedizinischen Grundlagenforschung (von Woedtke *et al.*, 2013). So können je nach Flächendosis der Plasmabehandlung letale oder stimulierende Effekte auf Zellen ausgeübt werden. Weiterhin werden die Expression von Oberflächenproteinen und die Zellmigration beeinflusst. Zusätzlich können durch Plasmaanwendung Zellen aus Zellverbänden herausgelöst werden (von Woedtke *et al.*, 2013). Diese Überlegungen benötigen weiterführende Untersuchungen sowie Analysen der vorhandenen Literatur.

Es konnte in der durchgeführten Studie gezeigt werden, dass die Bestrahlung mit kaltem atmosphärischem Plasma eine Verbesserung der initialen Attachmenthomogenität vor allem innerhalb der ersten 4 Stunden bewirkt. Diese werden auf die verbesserte Oberflächenbenetzbarkeit zurückgeführt. Dies gilt sowohl für maschinieren wie auch mikrostrukturierte Oberflächen. Die Verbesserung des initialen Attachments zeigte sich unabhängig von der Reaktivgaszusammensetzung und setzte sich über den gesamten Kultivierungszeitraum fort. Nach 12 bzw. 24 Stunden zeigten die Gingivafibroblasten auf den bestrahlten Titanoberflächen eine signifikant höhere Expression von fokalen Adhäsionsproteinen als auf den unbehandelten Kontrollen.

Die Betrachtung der Ergebnisse bezüglich des Attachmentverhaltens auf unterschiedlichen Oberflächenstrukturen ergab Unterschiede in der Besiedelung der verschiedenen Probekörper. Könönen *et al.* (1992) stellten in ihrer Untersuchung ein unterschiedliches Wachstum von humanen Gingivafibroblasten auf verschiedenen Titanoberflächen fest. Dies konnte in dieser Studie bestätigt werden. Ebenso konnte die Aussage von Könönen *et al.* (1992), dass Gingivafibroblasten auf maschinieren Titanoberflächen die besten Besiedlungsergebnisse zeigen, in dieser Studie belegt werden. Die Oberflächentopographie bestimmt das Adhäsionsverhalten von Zellen und die Ausprägung von Rezeptoren (Oates *et al.*, 2005). Diese beeinflussen Zellreaktionen, welches in vielen Studien untersucht wurde (Zhang *et al.*, 2011; Att *et al.*, 2009; Rompen *et al.*, 2006; Könönen *et al.*, 1992). Die Zellen zeigen auf maschinieren Oberflächen ein dichtes Wachstum in Schichten, während sie auf mikrostrukturierten der Topografie entlang und in die Tiefe der aufgerauten Oberfläche einwachsen (Lee *et al.*, 2009b; Könönen *et al.*, 1992). Die Oberflächentopographie des Substrates nimmt Einfluss auf die Orientierung der einzelnen Zelle (Meyle *et al.*, 1993). Dafür spielen Mikrotubuli, Mikrofilamente und Fokalkontakte eine große Rolle (Oakley *et al.*, 1993). Dabei wachsen ihre Mikrofilamente innerhalb der Rillen und Mikrostrukturen der angerauten Oberfläche. Dies kann gezielt eingesetzt werden, um durch eine mikrostrukturierte Implantatoberfläche Zellen an bestimmten Implantatanteilen anwachsen zu lassen. So kann beispielsweise verhindert werden, dass Epithelzellen an Implantaten in die Tiefe migrieren und eine Anlagerung von Osteoblasten behindern. Zusätzlich ermöglicht eine maschinierete Oberfläche die Adhäsion von Fibroblasten, die den Implantathals umschlingen und eine Abdichtung gegen Infektionen darstellen (Rompen *et al.*, 2006). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Attachments zeigte sich über den gesamten Zeitraum auf den bestrahlten Proben mit einer maschinieren Oberfläche ein besseres Attachment der Fibroblasten als auf den mikrostrukturierten. Rasterelektronenmikroskopisch konnte dieses Ergebnis nicht für alle Kultivierungszeiten bestätigt werden, da nach 24 Stunden nicht alle Proben eine Besiedelung aufwiesen. Auch der Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Proben konnte nur uneinheitlich durch die Rasterelektronenmikroskopie bestätigt werden. Für diese Auswertung wurden Übersichtsaufnahmen herangezogen. Detailaufnahmen in ausreichend hoher Vergrößerung wurden exemplarisch für den Nachweis des Attachments genutzt. Eine rasterelektronische Untersuchung und Auswertung aller Prüfkörper in hinreichend hohen Vergrößerungen war zeitlich nicht praktikabel. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Bedeckung war hier die günstigere Methode und zeigte eine flächigere Bedeckung der Titanoberflächen nach Bestrahlung. Alle Kontrollen, die mit den Trägergasen ohne Zündung dieser bestrahlt wurden, zeigten eine punkt-



förmige Besiedelung der Fibroblasten am Applikationsort. Dies bestätigte sich sowohl auf den maschinieren als auch auf den mikrostrukturierten Oberflächen über die gesamte Kultivierungszeit. Somit kann die Studie von Duske *et al.* (2012) auch für Gingivafibroblasten bestätigt werden. Morphologisch zeigten diese nach Bestrahlung der Proben ein länglicheres, flacheres Wachstum. Die Zellen auf den mitgeführten Kontrollen wiesen eine rundlichere Konfiguration auf. Dies bestätigt sich zum Teil bei Betrachtung der Größe. Hier zeigten sich bessere Ergebnisse auf den bestrahlten Probekörpern nach 12 Stunden Kultivierungsdauer. Nach 4 Stunden wurden gleich große Zellen auf den bestrahlten und den mitgeführten Proben gefunden. Lediglich nach 24 Stunden stellten sich die Fibroblasten auf den mitgeführten Kontrollen als größer heraus. Die genaue Betrachtung der Oberflächentopografie zeigte signifikante Unterschiede zwischen den maschinieren und mikrostrukturierten Proben über den gesamten Zeitraum. So wiesen die maschinieren Oberflächen größere Zellen nach Bestrahlung auf. Einzig nach 12 Stunden erwiesen sich die Vorteile der maschinieren Oberfläche als nicht signifikant. Auf dieser zeigten sich die Zellen länglicher, während sie auf mikrostrukturierten Proben in die Tiefe zu wachsen schienen. Die Untersuchungen bezüglich der Zellgröße gestalteten sich schwierig. So ließ sich die Bedeckung der Titanoberfläche auf den Übersichtsaufnahmen gut berechnen. Allerdings stellte sich die Darstellung der Zelumrisse als nicht realistisch dar. Da Gingivafibroblasten den Kontakt untereinander suchen und miteinander in Kontakt treten, überlagern sich die Zellkörper. So war es mit dem Bildauswertungsprogramm nicht möglich reale Zellanzahlen zu zählen. Daher wurde die Zellanzahl auf Bildausschnitten in einer höheren Vergrößerung bestimmt und diese mit der prozentualen Bedeckung der Übersichtsaufnahmen kombiniert. Dies beschreibt jedoch nur annähernde Ergebnisse, die miteinander in Relation zu setzen sind.

Unter Berücksichtigung dieser Limitation bestätigt die Analyse der Zellanzahl den Vorteil der Bestrahlung. Es zeigten sich über die gesamte Untersuchungsdauer signifikant bessere Ergebnisse für die mit dem Plasmajet behandelten Titanproben. Die Untersuchungen bezüglich der Gasbeimischungen ergaben unterschiedliche Resultate über den gesamten Untersuchungszeitraum. Diesen sollte in weiteren systematischen Studien nachgegangen werden. Beim Vergleich der Oberflächentopographie zeigten sich ebenfalls uneinheitliche Ergebnisse über den gesamten Zeitraum.

Die Untersuchungen bezüglich der biologischen Aktivität zeigten sowohl bei der ALP Analyse wie auch bei der WST-1 Auswertung keine klaren Unterschiede zwischen bestrahlten Proben und Kontrollen. Vor allem die hohen Standardabweichungen der WST-1 Werte erschwer-

ten die Interpretation. Die ALP Werte der bestrahlten Proben und der unbestrahlten Kontrollen unterschieden sich lediglich in der 4-Stunden-Kultur tendenziell. Es bestätigen sich hier die Ergebnisse der Analyse der Zellanzahl. Die nachgewiesene homogene Besiedlung der Oberflächen nach Plasmabestrahlung resultiert nicht in einer stark erhöhten Zellanzahl und damit keiner erhöhten biologischen Aktivität der gesamten Kultur. Auch kann die verbesserte Oberflächenbenetzbarkeit der Titanprobe dazu führen, dass die Gingivafibroblasten schneller in Kontakt miteinander treten. Dadurch kommt es schon nach kurzer Zeit zur Ausbildung einer Zellschicht. Dies kann zu einer Hemmung der Zellproliferation führen, der sogenannten Kontaktinhibition (Plattner H, 2011, Otten *et al.*, 1971).

### 5.5 Therapeutisches Potential – Ausblick

Die biologisch akzeptablen Temperaturen während der Versuchsdurchführung durch Einstellung definierter Parameter lassen neue Möglichkeiten für zukünftige klinische Anwendungen erhoffen. Die thermische Belastbarkeit des periimplantären Knochens, die in der Literatur mit einem Grenzwert von 44 °C angegeben wird, muss jedoch in jedem Fall beachtet werden (Eriksson *et al.*, 1984). Es sollten zusätzliche Untersuchungen erfolgen, die die Reaktion des periimplantären Gewebes bei Bestrahlung der Implantatoberfläche mit kaltem atmosphärischem Plasma bewerten. Eine weitere wichtige Zielsetzung ist die Prüfung von spezifischen Radikalfreisetzung und der Vermeidung harter UV-Strahlung verbunden mit der Anwendung von Plasma (Liebmann *et al.*, 2011; Ring *et al.*, 2010; Lademann *et al.*, 2009; Ptasińska *et al.*, 2010).

Die Verbesserung der Oberflächenbenetzbarkeit durch die Anwendung kalter atmosphärischer Plasmen und die Verbesserung der initialen Attachmenthomogenität lassen der Plasmabehandlung einen zukünftigen Anteil bei der Oberflächenbehandlung von Implantaten zukommen (Yoshinari *et al.*, 2009; Lopez-Heredia *et al.*, 2008). Zusätzlich können kalte atmosphärische Plasmen für die Desinfektion und Dekontamination von Oberflächen angewandt werden (Idlibi *et al.*, 2013; Wind *et al.*, 2009; Berglundh *et al.*, 1991). Dabei kann die Beimischung von Sauerstoff zu Helium oder Argon Plasma zu einer nachweislich besseren antiseptischen Wirkung beitragen und die Wundheilung fördern (Matthes *et al.*, 2012; Isbary *et al.*, 2011; Ermolaeva *et al.*, 2011). Vor allem die Möglichkeit, mittels Plasmen Spalten und Hohlräume zu reinigen, zeichnen diese als wirksame Methode zur Biofilmreduktion aus (Koban *et al.*, 2011; Rupf *et al.*, 2011; Rupf *et al.*, 2010b; Joshi *et al.*, 2010; Sladek *et al.*, 2007). Dies eröffnet einerseits neue klinische Möglichkeiten im Bereich der Periimplantitistherapie. Andererseits stellen sich dadurch neue Perspektiven in der Kavitätenreinigung, bei der die Dekonta-

mination der Oberfläche ohne Substanzverlust erwünscht ist, dar (Sladek *et al.*, 2007; Sladek *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Einsatz kalter atmosphärischer Plasmen in der Füllungstherapie, speziell mit dem Einfluss auf den Zahn-Komposit-Verbund (Rupf *et al.*, 2010a). Die Möglichkeiten der Dekontamination, Desinfektion und Verbesserung der Oberflächenbesiedelung der Zellen durch Plasmabestrahlung ergeben ein vielfältiges klinisches Potential für die Therapie der Periimplantitis. Zusätzlich besteht die Chance durch eine Variation der Plasmaquellengestaltung (Plasmajet, Trägergas) bestimmte biologische Wirkungen zu erreichen, um diese therapeutisch anwenden zu können. Die *In-vitro*-Studie kann allerdings nur einen kleinen Ausblick auf die künftigen Möglichkeiten der Plasmabehandlung geben. Es sind weitere *In-vitro*-, Tier- und klinische Studien notwendig, um die Möglichkeiten und Chancen des kalten atmosphärischen Plasmas in der Zahnmedizin zu erfassen. Es steht jedoch außer Frage, dass die Anwendung kalter atmosphärischer Plasmen interessante Möglichkeiten für die Periimplantitistherapie von Titanimplantaten bietet.

## 5.6 Schlussfolgerungen

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bestrahlung von Titanoberflächen mit kaltem atmosphärischem Plasma das Attachment der Zellen flächenbezogen homogenisiert. Die verwendeten primären humanen Fibroblasten zeigten mehr fokale Kontakte, wenn die Oberflächen zuvor mit kaltem Plasma bestrahlt wurden. Die Zellmorphologie stellte sich auf den bestrahlten Oberflächen verändert dar. Die Fibroblasten wiesen eine länglichere Konfiguration auf. Die Zellproliferation und die Zellviabilität wurden nicht beeinflusst.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Aita H, Hori N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, Ogawa T (2009)** The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*: 1015-1025.
2. **Albrektsson T, Gottlow J, Meirelles L, Ostman PO, Rocci A, Sennerby L (2007)** Survival of NobelDirect implants: an analysis of 550 consecutively placed implants at 18 different clinical centers. *Clin Implant Dent Relat Res*: 65-70.
3. **Albrektsson T, Isidor F (1994)** Consensus report: Implant therapy. Proceeding of the 1st European Workshop on Periodontology. *Quintessence*: 365-369.
4. **Att W, Yamada M, Ogawa T (2009)** Effect of titanium surface characteristics on the behavior and function of oral fibroblasts. *Int J Oral Maxillofac Implants*: 419-431.
5. **Augthun M, Tinschert J, Huber A (1998)** In vitro studies on the effect of cleaning methods on different implant surfaces. *J Periodontol*: 857-864.
6. **Baron M, Haas R, Dörtbudak O, Watzek G (2000)** Experimentally induced peri-implantitis: a review of different treatment methods described in the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*: 533-544.
7. **Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P (1991)** The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res*: 81-90.
8. **Berglundh T, Persson L, Klinge B (2002)** A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol*: 197-212.
9. **Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M (2011)** Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *J Clin Periodonto*: 188–202.
10. **Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2005)** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*: 127-152.
11. **Bornstein MM, Schmid B, Belser UC, Lussi A, Buser D (2005)** Early loading of non-submerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface. 5-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res*: 631-638.

12. **Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindsrom J, Ohlsson A (1969)** Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*: 81-100.
13. **Bray DF, Bagu J, Koegler P (1993)** Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldrill and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimen. *Microsc Res Tech*: 489-495.
14. **Brunette DM, Chehroudi B (1999)** The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *J Biomech Eng*: 49-57.
15. **Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M (2010)** In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*: 156-164.
16. **Buser D, Belser UC (1998)** Fortschritte und aktuelle Trends in der oralen Implantologie. *Schweiz Monatschr Zahnmed*: 327-342.
17. **Chung DM, Oh TJ, Shotwell JL, Misch CE, Wang HL (2006)** Significance of keratinized mucosa in maintenance of dental implants with different surfaces. *J Periodontol*: 1410-1420.
18. **Cochran DL, Buser D, ten Bruggenkate CM, Weingart D, Taylor TM, Bernard JP, Peters F, Simpson JP (2002)** The use of reduced healing times on ITI implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: early results from clinical trials on ITI SLA implants. *Clin Oral Implants Res*: 144-53.
19. **Cochran DL, Simpson J, Weber HP, Buser D (1994)** Attachment and Growth of Periodontal Cells on Smooth and Rough Titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants*: 289-297.
20. **Coulombe S, Léveillé V, Yonson S, Leask RL (2006)** Miniature atmospheric pressure glow discharge torch (APGD-t) for local biomedical applications. *Pure Appl Chem*: 1147-1156.
21. **Critchley DR (2000)** Focal adhesions—the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol* 12: 133-139.
22. **Cruz MT, Dalgard CL, Ignatius MJ (1997)** Functional partitioning of beta1 integrins revealed by activating and inhibitory mAbs. *J Cell Sci*: 2647-2659.

23. **Deng XT, Shi JJ, Chen HL, Kong MG (2007)** Protein destruction by atmospheric pressure glow discharges. *Appl Phys Lett*: 90.
24. **DENTSPLY/Friadent.** Fragen und Antworten zu Qualitätsimplantaten von DENTSPLY Friadent. <http://www.implantsforlife.com/index.htm>. [Online] [Zitat vom: 05. 10 2013.] <http://www.implantsforlife.com/index.htm>.
25. **Dowben RM (1969)** *Biological Membranes*, Boston: Little, Brown and Co.
26. **Duske K, Koban I, Kindel E, Schröder K, Nebe B, Holtfreter B, Jablonowski L, Weltmann KD, Kocher T (2012).** Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. *J Clin Periodontol*: 400-407.
27. **Ehlbeck J, Schnabel U, Polak M, Winter J, von Woedtke TH, Brandenburg R, von dem Hagen T, Weltmann KD (2011)** Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma Sources for Microbial Decontamination. *Journal of Physics D: Applied Physics*:. doi:10.1088/0022-3727/44/1/013002.
28. **Eickholz P, Dannewitz B (2012)** Glossar der Grundbegriffe für die Praxis: Anatomie des Parodonts. *Parodontologie*: 415-420.
29. **Eriksson RA, Albrektsson T (1984)** The effect of heat on bone regeneration: an experimental study in the rabbit using the bone growth chamber. *J Oral Maxillofac Surg*: 705-711.
30. **Ermolaeva SA, Varfolomeev AF, Chernukha MY, Yurov DS, Vasiliev MM, Kaminskaya AA, Moisenovich MM, Romanova JM, Murashev AN, Selezneva II, Shimizu T, Sysolyatina EV, Shaginyan IA, Petrov OF, Mayevsky EI, Fortov VE, Morfill GE, Naroditsky BS, Gintsburg AL (2011)** Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J Med Microbiol*: 75-83.
31. **Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV (2012)** Treatment of peri-implantitis: what interventions are effective? A Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol*: 21-41.
32. **Geiger B, Volk T, Volberg T, Bendori R (1987)** Molecular interactions in adherens-type contacts. *J Cell Sci Suppl*: 251-272.
33. **Geminiani A, Caton JG, Romanos G (2011)** Temperature increase during CO(2) and Er:YAG irradiation on implant surfaces. *Implant dentistry*: 379-382.

34. **Geminiani A, Caton JG, Romanos GE (2012)** Temperature change during non-contact diode laser irradiation of implant surfaces. *Lasers in Medical Science*: 339-342.
35. **Gernet W, Biffar R, Schwenzer N, Ehrenfeld M (2007)** *Zahnärztliche Prothetik*. Stuttgart, New York: Thieme Verlag: 247.
36. **Gonçalves F, Zanetti AL, Zanetti RV, Martelli FS, Avila-Campos MJ, Tomazinho LF, Granjeiro JM (2010)** Effectiveness of 980-nm diode and 1064-nm extra-long-pulse neodymium-doped yttrium aluminum garnet lasers in implant disinfection. *Photomed Laser Surg*: 273-280.
37. **Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Bürgers R (2010)** Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res*: 866-872.
38. **Heitz-Mayfield LJ (2008)** Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol*: 292-304.
39. **Heitz-Mayfield LJ, Lang NP (2010)** Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol 2000*: 167-181.
40. **Hellwig E, Klimek J, Attin T (2009)** *Einführung in die Zahnerhaltung*. Köln: Dt. Zahnärzte Verlag: 435-446.
41. **Hermann JS, Buser D, Schenk RK, Higginbottom FL, Cochran DL (2000)** Biologic width around titanium implants. A physiologically formed and stable dimension over time. *Clin Oral Implants Res*: 1-11.
42. **Hugger A, Türp JC, Kerschbaum T (Hrsg) (2006)** *Curriculum - Orale Physiologie*. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH: 240.
43. **Idlibi AN, Al-Marrawi F, Hannig M, Lehmann A, Rueppell A, Schindler A, Jentsch H, Rupf S (2013)** Destruction of oral biofilms formed in situ on machined titanium (Ti) surfaces by cold atmospheric plasma. *Biofouling*: 369-379.
44. **Isbary G, Morfill G, Schmidt HU, Georgi M, Ramrath K, Heinlin J, Karrer S, Landthaler M, Shimizu T, Steffes B, Bunk W, Monetti R, Zimmermann JL, Pompl R, Stolz W (2010)** A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *Br J Dermatol*: 78-82.

45. **Isbary G, Morfill G, Zimmermann J, Shimizu T, Stolz W (2011)** Cold atmospheric plasma: a successful treatment of lesions in Hailey-Hailey disease. *J Arch Dermato*: 388-390.
46. **Ito T, Sakano S, Sato K, Sugiura H, Iwata H, Murata Y, Seo H (1995)** Sensitivity of osteoinductive activity of demineralized and defatted rat femur to temperature and duration of heating. *Clin Orthop Relat Res*: 267-275.
47. **Jablonowski L, Koban I, Berg MH, Kindel E, Duske K, Schröder K, Weltmann KD, Kocher T (2013a)** Elimination of *E.faecalis* by a new non-thermal atmospheric pressure plasma handheld device for endodontic treatment a preliminary investigation. *Plasma Processes and Polymers*: doi: 10.1002/ppap.201200156.
48. **Jablonowski L, Koban I, Kocher T (2013b)** Plasmamedizin in der Zahnmedizin. *Hyg Med*: 206–211.
49. **Jiang C, Chen MT, Gorur A, Schaudinn C, Jaramillo DE, Costerton JW, Sedghizadeh PP, Vernier PT, Gundersen MA (2009)** Nanosecond pulsed plasma dental probe. *Plasma Process Polym*: 479-483.
50. **Joaquin JC, Kwan C, Abramzon N, Vandervoort K, Brelles-Mariño G (2009)** Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation? *Microbiology*: 724-732.
51. **Joshi SG, Paff M, Friedman G, Fridman G, Fridman A, Brooks AD (2010)** Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: a biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *Am J Infect Control*: 293-301.
52. **Kaemmerer PW, Lehmann KM, Karbach J, Wegener J, Al-Nawas B, Wagner W (2011)** Prevalence of peri-implant diseases associated with a rough-surface dental implant system 9 year after insertion. *Int J Oral Imp Clin Res*; 2: 135-139.
53. **Karoussis IK, Brägger U, Salvi GE, Bürgin W, Lang NP (2004a)** Effect of implant design on survival and success rates of titanium oral implants: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res*: 8-17.
54. **Karoussis IK, Müller S, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Brägger U, Lang NP (2004b)** Association between periodontal and peri-implant conditions: a 10-year prospective study. *Clin Oral Implants Res*: 1-7.



55. **Kawahara H, Kawahara D, Mimura Y, Takashima Y, Ong JL (1998)** Morphologic studies on the biologic seal of titanium dental implants. Report II. In vivo study on the defending mechanism of epithelial adhesions/attachment against invasive factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*: 465-473.
56. **Koban I, Holtfreter B, Hübner NO, Matthes R, Sietmann R, Kindel E, Weltmann KD, Welk A, Kramer A, Kocher T (2011)** Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro - proof of principle experiment. *J Clin Periodontol*: 956-965.
57. **Kolb F, Mohamed AAH, Price RO, Swanson RJ, Bowman A, Chiavarini RL, Stacey M, Schoenbach KH (2008)** Cold atmospheric pressure air plasma jet for medical applications. *Appl Phys Lett*, 92, 24150.
58. **Könönen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I (1992)** Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res*: 1325-1341.
59. **Konsensuskonferenz Implantologie, BDIZ ED (2002)** Indikationsklassen für Regelfallversorgungen in der Implantologie.
60. **Lademann J, Richter H, Alborova A, Humme D, Patzelt A, Kramer A, Weltmann KD, Hartmann B, Ottomann C, Fluhr JW, Hinz P, Hübner G, Lademann O (2009)** Risk assessment of the application of a plasma jet in dermatology. *J Biomed Opt*: doi:10.1117/1.3247156
61. **Lang NP, Berglundh T (2011)** Periimplant diseases: where are we now? – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*: 178–181.
62. **Langmuir I, Mott-Smith HM (1926)** The Theory of Collectors in Gaseous Discharges. *Phys. Rev*: 727-703.
63. **Laroussi M (2005)** Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art. *Plasma Processes and Polymers*: 391-400.
64. **Laroussi M, Hynes W, Akan T, Lu X, Tendero C (2008)** The Plasma Pencil: A Source of Hypersonic Cold Plasma Bullets for Biomedical Applications. *IEEE Trans Plasma Sci*: 1298-1299.
65. **Laroussi M, Tendero C, Lu X, Alla S, Hynes WL (2006)** Inactivation of bacteria by the Plasma Pencil. *Plasma Proc Polym*: 470-473.

66. **Lee HW, Kim GJ, Kim JM, Park JK, Lee JK, Kim GC (2009a)** Tooth bleaching with nonthermal atmospheric pressure plasma. *J Endod*: 587-591.
67. **Lee SW, Kim SY, Rhyu IC, Chung WY, Leesungbok R, Lee KW (2009b)** Influence of microgroove dimension on cell behavior of human gingival fibroblasts cultured on titanium substrata. *Clin Oral Implants Res*: 56-66.
68. **Lehmann A, Rueppell A, Schindler A, Zylla IM, Seifert HJ, Nothdurft F, Hannig M, Rupf S (2013)** Modification of Enamel and Dentin Surfaces by Non-Thermal Atmospheric Plasma. *Plasma Process Polym*: 262-270.
69. **Liebmann J, Scherer J, Bibinov N, Rajasekaran P, Kovacs R, Gesche R, Awakowicz P, Kolb-Bachofen V (2011)** Biological effects of nitric oxide generated by an atmospheric pressure gas-plasma on human skin cells. *Nitric Oxide*: 8-16.
70. **Lindhe J, Meyle J (2008)** Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*: 282–285.
71. **Listgarten MA, Lai CH (1999)** Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol*: 431-437.
72. **Listgarten MA, Lang NP, Schroeder A (1991)** Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants. *Clin Oral Impl Res*: 1-19.
73. **Lopez-Heredia MA, Legeay G, Gaillard C, Layrolle P (2008)** Radio frequency plasma treatments on titanium for enhancement of bioactivity. *Acta Biomater*: 1953-1962.
74. **Luterbacher S, Mayfield L, Brägger U, Lang NP (2000)** Diagnostic characteristics of clinical and microbiological tests for monitoring periodontal and peri-implant mucosal tissue conditions during supportive periodontal therapy (SPT). *Clin Oral Implants Res*: 521-529.
75. **Manner H (2008)** Argon plasma coagulation therapy. *Curr Opin Gastroenterol*: 612-616.
76. **Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C (2005)** Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res*: 650-656.
77. **Masaoka S (2007)** Plasma sterilization of polyethylene terephthalate bottles by pulsed corona discharge at atmospheric pressure. *Biocontrol Sci*: 59-63.

78. **Massaro C, Rotolo P, De Riccardis F, Milella E, Napoli A, Wieland M, Textor M, Spencer ND, Brunette DM (2002)** Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. *J Mater Sci Mater Med*: 535-548.
79. **Matthes R, Bekeschus S, Bender C, Koban I, Hübner NO, Kramer A (2012)** Pilot-study on the influence of carrier gas and plasma application (open resp. delimited) modifications on physical plasma and its antimicrobial effect against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*. doi: 10.3205/dgkh000186.
80. **McComb RB, Bowers GN, Posen S (1979)** Alkaline Phosphatase. *Plenum Press, New York*.
81. **Melamies IA (2009)** Selektiv reinigen und beschichten mit atmosphärischem Plasma. *Coating*: 3-8.
82. **Meyle J, Gültig K, Wolburg H, von Recum AF (1993)** Fibroblast anchorage to micro-textured surfaces. *J Biomed Mater Res*: 1553-1557.
83. **Mombelli A, Lang NP (1992)** Antimicrobial treatment of peri-implant infections. *Clin Oral Implants Res*: 162-168.
84. **Mombelli A, Müller N, Cionca N (2012)** The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*: 67-76.
85. **Mombelli, A (2002)** Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol 2000*: 177-189.
86. **Narayanan AS, Page RC (1983)** Connective tissues of the periodontium:a summary of current work. *Coll Relat Res*: 33-64.
87. **Neukam F (2000)** Lebenserwartung von Implantaten und Implantatlager. *Stellungnahmen der DGZMK V 1.1, Stand 4/00*.
88. **Neukam FW, Wichmann M, Wiltfang J (2007)** *Zahnärztliche Implantologie unter schwierigen Umständen*. Stuttgart, New York: Thieme Verlag: 93.
89. **Nosenko T, Shimizu T, Morfill GE (2009)** Designing plasmas for chronic wound disinfection. *New J Phys*: 115013.

90. **Novaes AB Jr, de Souza SL, de Barros RR, Pereira KK, Iezzi G, Piattelli A (2010).** Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J*: 471-481.
91. **Ntrouka VI, Slot DE, Louropoulou A, van der Weijden F (2011)** The effect of chemotherapeutic agents on contaminated Ti surfaces: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research*: 681-690.
92. **Oakley C, Brunette DM (1993)** The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata. *J Cell Sci*: 343-354.
93. **Oates TW, Maller SC, West J, Steffensen B (2005)** Human gingival fibroblast integrin subunit expression on titanium implant surfaces. *J Periodontol*: 1743-1750.
94. **Ogawa T, Sukotjo C, Nishimura I (2002)** Modulated bone matrix-related gene expression is associated with differences in interfacial strength of different implant surface roughness. *J Prosthodont*: 241-247.
95. **Otten J, Johnson GS, Pastan I (1971)** Cyclic AMP levels in fibroblasts: relationship to growth rate and contact inhibition of growth. *Biochem Biophys Res Commun*: 1192-1198.
96. **Pan J, Sun K, Liang Y, Sun P, Yang X, Wang J, Zhang J, Zhu W, Fang J, Becker KH (2013)** Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with enterococcus faecalis biofilms in vitro. *J Endod*: 105-110.
97. **Paquette DW, Ryan ME, Wilder RS (2008)** Locally delivered antimicrobials: clinical evidence and relevance. *J Dent Hyg*: 10-15.
98. **Park JK, Nam SH, Kwon HC, Mohamed AA, Lee JK, Kim GC (2011)** Feasibility of nonthermal atmospheric pressure plasma for intracoro-nal bleaching. *Int En-dod J*: 1365-2591.
99. **Plattner H, Hentschel J (2011)** *Zellbiologie*. Stuttgart, New York: Thieme: 123.
100. **Ptasińska S, Bahnev B, Stypczyńska A, Bowden M, Mason NJ, Braithwaite NS (2010)** DNA strand scission induced by a non-thermal atmospheric pressure plasma jet. *Phys Chem Chem Phys*: 7779-7781.
101. **Radlanski, RJ (2011)** *Curriculum Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie*. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH: 343-348; 388-390.

102. **Rateitschak KH, Rateitschak EM, Wolf HF (2004)** *Farbatlanten der Zahnmedizin, Parodontologie*. [Hrsg.] Wolf HF, Rateitschak KH. Stuttgart, New York: Thieme Verlag: 8-13. Bd. 1.
103. **Ring A, Langer S, Schaffran A, Stricker I, Awakowicz P, Steinau HU, Hauser J (2010)** Enhanced neovascularization of dermis substitutes via low-pressure plasma-mediated surface activation. *Burns*: 1222-1227.
104. **Ritts AC, Li H, Yu Q, Xu C, Yao X, Hong L, Wang Y (2010)** Dentin surface treatment using a non-thermal argon plasma brush for interfacial bonding improvement in composite restoration. *Eur J Oral Sci*: 510-516.
105. **Rizzi G, Scrivani A, Fini M, Giardino R (2004)** Biomedical coatings to improve the tissue-biomaterial interface. *Int J Artif Organs*: 649-657.
106. **Roccuzzo M, Bonino F, Aglietta M, Dalmaso P (2012)** 10-year results of a three arms prospective cohort study on implants in periodontally compromised patients. Part 2: clinical results. *Clin Oral Implants Res*: 389-395.
107. **Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes AE, Piattelli A (2006)** The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clin Oral Implants Res*: 55-67.
108. **Roos-Jansåker AM (2007)** Long time follow up of implant therapy and treatment of peri-implantitis. *Swed Dent J Suppl*: 7-66.
109. **Rühling A, Kocher T, Kreusch J, Plagmann HC (1994)** Treatment of subgingival implant surfaces with Teflon-coated sonic and ultrasonic scaler tips and various implant curettes. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*: 19-29.
110. **Rupf S, Idlibi AN, Al-Marrawi FA, Hannig M, Schubert A, von Mueller L, Spitzer W, Holtmann H, Lehmann A, Rueppell A, Schindler A (2011)** Removing biofilms from microstructured titanium ex vivo: a novel approach using atmospheric plasma technology. *PLoS One*. 6:e25893
111. **Rupf S, Idlibi AN, Umanskaya N, Hannig M, Nothdurft F, Lehmann A, Schindler A, von Müller L, Spitzer W (2012)** Disinfection and removal of biofilms on microstructured titanium by cold atmospheric plasma. *JDI*: 126-137.

112. **Rupf S, Lehmann A, alMuhammad M, Schäfer B, Hannig M, Schindler A (2010a)** Morphological Changes on Human Dentin Caused by Irradiation with a Cold Atmospheric Plasma Jet. *Caries Res*: 171–247.
113. **Rupf S, Lehmann A, Hannig M, Schäfer B, Schubert A, Feldmann U, Schindler A (2010b)** Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet. *J Med Microbiol*: 206-212.
114. **Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, de Wild M, Wieland M, Geis-Gerstorfer J (2006)** Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A*: 323-334.
115. **Sahm N, Becker J, Santel T, Schwarz F (2011)** Non-surgical treatment of peri-implantitis using an air-abrasive device or mechanical debridement and local application of chlorhexidine: a prospective, randomized, controlled clinical study. *J Clin Periodontol*: 872-878.
116. **Sanikop S, Pati S, Agrawal P (2012)** Gingival crevicular fluid alkaline phosphatase as a potential diagnostic marker of periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol*: 513-518.
117. **Santos VR, Gomes RT, Resende M, de Almeida OP, Colleta RD (2010)** Isolation and characterization of gingival fibroblasts positive for alkaline phosphatase in patients with chronic periodontitis and drug-induced gingival hyperplasia. *Rev odonto ciênc*: 54-58.
118. **Schlegel KA, Janson O, Heumann CH, Toutenburg H (1994)** Attached gingiva and periimplantitis. *Z Zahnärztl Implantol*: 212-218.
119. **Schliephake H, Neukam FW, Scheller H, Bothe KJ (1994)** Local ridge augmentation using bone grafts and osseointegrated implants in the rehabilitation of partial edentulism; preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants*: 557.
120. **Schroeder HE, Münzel-Pedrassoli S, Page R (1973)** Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man. *Arch Oral Biol*: 899-923.
121. **Schrott AR, Jimenez M, Hwang JW, Fiorellini J, Weber HP (2009)** Five-year evaluation of the influence of keratinized mucosa on peri-implant soft-tissue health and

- stability around implants supporting full-arch mandibular fixed prostheses. *Clin Oral Implants Res*: 1170-1077.
122. **Schwartz Z, Nasazky E, Boyan BD (2005)** Surface microtopography regulates osteointegration: the role of implant surface microtopography in osteointegration. *Alpha Omegan*: 9-19.
  123. **Schwarz F, Ferrari D, Popovski K, Hartig B, Becker J (2009)** Influence of different air-abrasive powders on cell viability at biologically contaminated titanium dental implants surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*: 83-91.
  124. **Schwarz F, Papanicolau P, Rothamel D, Beck B, Herten M, Becker J (2006)** Influence of plaque biofilm removal on reestablishment of the biocompatibility of contaminated titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A*: 437-444.
  125. **Schwarz F, Sculean A, Romanos G, Herten M, Horn N, Scherbaum W, Becker J. (2005)** Influence of different treatment approaches on the removal of early plaque biofilms and the viability of SAOS2 osteoblasts grown on titanium implants. *Clin Oral Investig*: 111-117.
  126. **Serino G, Strom C (2009)** Peri-implantitis in partially edentulous patients: association with inadequate plaque control. *Clin Oral Implants Res*: 169-174.
  127. **Silva SS, Luna SM, Gomes ME, Benesch J, Pashkuleva I, Mano JF, Reis RL (2008)** Plasma surface modification of chitosan membranes: characterization and preliminary cell response studies. *Macromol Biosci*: 568-576.
  128. **Sladek REJ, Filoche SK, Sisson CH, Stoffels E (2007)** Treatment of Streptococcus mutans biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. *Lett Appl Microbiol*: 318-323.
  129. **Sladek REJ, Stoffels E, Walraven R, Tielbeek PJA (2004)** Plasma treatment of dental cavities: a feasibility study. *IEEE Trans Plasma Sci*: 1540-1543.
  130. **Small SA, Zinner ID, Panno FV, Sharpiro HJ, Stein JI (1993)** Augmenting the maxillary sinus for implants: report of 27 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants*: 523-528.
  131. **Stoffels E, Flikweert AJ, Stoffel WW, Kroesen GMW (2002)** Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio)materials. *Plasma Sources Sci Technol*: 383-388.

132. **Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A (2001)** Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. *J Biomed Mater Res*: 570-592.
133. **Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD (1992)** DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry, Bd. 31, Nr. 12*: 3103–3112.
134. **Tint IS, Neifakh AA, Bershadskiĭ AD (1987)** Focal contacts and the cytoskeleton. *Tsitologĭia*: 739-748.
135. **Todescan S, Lavigne S, Kelekis-Cholakis A (2012)** Guidance for the Maintenance Care of Dental Implants: Clinical Review. *J Can Dent Assoc*: 107.
136. **van der Flier A, Sonnenberg A (2001)** Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305: 285-298.
137. **von Ardenne M, Musiol G, Klemradt U (2005)** *Effekte der Physik und ihre Anwendungen*. Frankfurt: Harri Deutsch: 252-288.
138. **von Arx T, Kurt B, Hardt N (1997)** Treatment of severe peri-implant bone loss using autogenous bone and a resorbable membrane. Case report and literature review. *Clin Oral Implants Res*: 517-526.
139. **von Woedtke T, Weltmann KD (2013)** Erkenntnisse über Mechanismen biologischer Plasmawirkungen und mögliche Konsequenzen für therapeutische Anwendungen. 3. *Workshop Plasmamedizin*.
140. **Vörös J, Wieland M, Ruiz-Taylor L, Textor M, Brunette DM (2001)** Characterization of Titanium Surfaces. *Engineering Materials*: 87-144.  
  
**Walsh JL, Shi JJ, Kong MG (2006)** Contrasting characteristics of pulsed and sinusoidal cold atmospheric plasma jets. *Appl Phys Lett*: 171501-171501-3.
141. **Wehner R, Gehring WJ (2013)** *Zoologie*. Stuttgart, New York: Thieme Verlag: 28.
142. **Wei J, Igarashi T, Okumori N, Igarashi T, Maetani T, Liu B, Yoshinari M (2009)** Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater*: doi:10.1088/1748-6041/4/4/045002.
143. **Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H (1988)** Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem*: 12002-12010.



144. **Wetzel AC, Vlassis J, Caffesse RG, Hämmerle CH, Lang NP (1999)** Attempts to obtain re-osseointegration following experimental peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res*: 111-119.
145. **Wilke A, Traub F, Wilke M, Endres S, Wanner F, Jäger M (2002)** Biokompatibilitätstestung orthopädischer Werkstoffe in vitro. Eine kritische Literaturübersicht. Teil IV: Metalle. *OSTEOLOGIE*: Bde. 11, Heft 4: 241-265.
146. **Willershausen B, Gängler P, Hoffmann T (2010)** *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie*. Stuttgart, New York: Thieme Verlag: 48-50.
147. **Wind D, Rupf S, Schäfer B, Hannig M, Lehmann A, Hofmann T, Schindler A (2009)** Treatment of ex vivo biofilms by non-thermal atmospheric plasma jet. *Caries Research*: 179–244.
148. **Wintermantel E, Ha SW (2009)** *Medizintechnik: Life Science Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer: 840.
149. **Yamano S, Ma AK, Shanti RM, Kim SW, Wada K, Sukotjo C (2011)** The influence of different implant materials on human gingival fibroblast morphology, proliferation, and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants*: 1247-1255.
150. **Yoshinari M, Wei J, Matsuzaka K, Inoue T (2009)** Effect of cold plasma-surface modification on surface wettability and initial cell attachment. *World Acad Sci Eng Technol*: 171-175.
151. **Yu QS, Huang C, Hsieh FH, Huff H, Duan Y (2007)** Bacterial inactivation using a low-temperature atmospheric plasma brush sustained with argon gas. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*: 211-219.
152. **Zhang F, Huang Y, Li X, Zhao S (2011)** Surface modification and its effect on attachment, spreading, and proliferation of human gingival fibroblasts. *Int J Oral Maxillofac Implants*: 1183-1192.
153. **Zhu S, Huang N, Xua L, Zhang Y, Liu H, Lei Y, Sun H, Yao Y (2009)** Bio-compatibility of Fe–O films synthesized by plasma immersion ion implantation and deposition. *Surface and Coatings Technology*: 1523-1529.
154. **Zitzmann NU, Berglundh T (2008)** Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*: 286-291.

155. **Zitzmann NU, Walter C, Berglundh T (2006)** Ätiologie, Diagnostik und Therapie der Periimplantitis – eine Übersicht. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*: 642-649.
156. **Zitzmann, NU (2013)** Periimplantäre Mukositis und Periimplantitis. Definition und Prävalenz der Erkrankungen. *Parodontologie*: 133-138.

## 7 Publikation / Danksagung

### 7.1 Publikation

Abstract V6, 45. Jahrestagung der AfG, Januar 2013, Mainz

S. Rupf, M. Lange, C. Mayer, M. Hannig, A. Lehmann, A. Schindler, A. Schubert, W. Metzger

**Kaltes atmosphärisches Plasma verbessert die Besiedlung von Titan mit primären humanen Osteoblasten**

Eingereicht:

Abstract 708, 87. wissenschaftliche Jahrestagung der DGKFO - Parallelsymposium für Nachwuchswissenschaftler, September 2014, München

C. Mayer, S. Rupf, J. Lisson

**Verbesserung des Adhärenzverhaltens von Gingivafibroblasten auf Implantatoberflächen durch Konditionierung mit kaltem Plasma**

### 7.2 Förderung

Diese Arbeit wurde unterstützt durch die „Freunde des Universitätsklinikums des Saarlandes e.V.“, die Universität des Saarlandes (Projekt T 6031500-09) und mit Haushaltsmitteln der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, des Fraunhofer-Instituts für Zelltherapie und Immunologie (IZI), Leipzig und des Leibniz-Instituts für Oberflächenmodifizierung e.V. (IOM), Leipzig.

Es besteht kein Interessenskonflikt.

### 7.3 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. dent. Stefan Rupf danke ich für die Vergabe des Themas und die Betreuung während der Arbeit. Ich danke ihm für die Unterstützung und die Diskussionen, die diese Arbeit entstehen ließen.

Danken möchte ich Herrn Markus Lange, für die gemeinsam durchgeführten Voruntersuchungen in Leipzig und Homburg/Saar, bei der Entwicklung der Versuchsaufbauten und der Zellkultur.

Vielen Dank dem Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung e.V. (IOM) in Leipzig, besonders Herrn PD Dr. rer. nat. Axel Schindler, Dipl.-Ing. Antje Lehman und Dipl.-Ing. André Rueppell für die Hilfe bei der Arbeit mit der Plasmaquelle und den zur Verfügung gestellten Abbildungen.

Ein herzliches Dankeschön geht an die Mitarbeiter der AG „Vaskuläre Biologie“ unter Dr. rer. nat. Andreas Schubert des Fraunhofer-Instituts für Zelltherapie und Immunologie (IZI) in Leipzig, insbesondere Frau Nicole Pietzsch für ihre tatkräftige Unterstützung und Erklärung bei der Aufzucht der Zellen und Durchführung der Versuchsreihen.

Ich möchte Frau Silke Gäth und Frau Dr. rer. nat. Barbara Schäfer für die freundliche Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit und der Einführung in die Zellkultivierung danken.

Herrn Norbert Pütz danke ich für seine Unterstützung und Einführung am Rasterelektronenmikroskop.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der Universitätsklinik des Saarlandes, insbesondere Herrn Professor Dr. med. dent. Matthias Hannig danken.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, meine Geschwister und an Philipp Linsenmann, für die unermüdliche Unterstützung und Motivation.

Abschließend möchte ich meinen Freunden sowie meinen Arbeitskolleginnen und Herrn Professor Dr. med. dent. Jörg Lisson für ihre Unterstützung von ganzem Herzen danken, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## 8 Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name: Constanze Charlotte Mayer  
Adresse: Schumannstr. 48  
66111 Saarbrücken  
Geburtsdatum: 02. August 1984  
Geburtsort: Freiburg i. Brsg.  
Nationalität: deutsch

### **Ausbildung**

1987 – 1991 Kindergarten St. Gallus, Merzhausen  
1991 – 1995 Hexentalgrundschule, Merzhausen  
1995 – 2004 St. Ursula-Gymnasium, Freiburg i. Brsg.  
2004 – 2005 Freiwilliges soziales Jahr, Lebenshilfe Tirol, Reutte/Tirol, A  
2005 – 2006 Pflegepraktikum, Loretto Krankenhaus, Freiburg i. Brsg.  
2006 – 2012 Studium der Zahnmedizin an der Universität des Saarlandes,  
Homburg/Saar

### **Beruflicher Werdegang**

15.10.2012 – 31.08.2013 Assistenz Zahnärztin, Praxis Dr. Dippel, Saarbrücken  
Seit 01.09.2013 Weiterbildungsassistentin, Klinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

## 9 Anhang

### Geräte und Programme

Mikroskop

REM

Sputter

Pipettus

Pipetten

Fluoreszenzmikroskop

Zentrifuge

Sicherheitswerkbank

Inkubator

ELISA Reader

Adobe Photoshop CS5 (64bit)

Image J 1.43u für Microsoft Windows

AxioVision Programm

Microsoft Office

### Materialien

Zellkulturflasche

Pipettenspitzen

Wellplatte

### Hersteller

LEICA DMIL; LEICA Microsystems Framework, Wetzlar (D)

FEI XL 30; Fei, Eindhoven (NL)

Sputter Coater SC 7640; Quorum Technologies Ltd., Newhaven (GB)

Accu-Jet pro; Brand, Wertheim (D)

Eppendorf Reference; Eppendorf AG, Hamburg (D)

Axio Scope A1, Carl Zeiss, Göttingen (D)

Heraeus Multifuge 3SR+; Thermo Scientific, Waltham (USA)

Hera safe KSP 12; 1/PE AC; Thermo Scientific, Waltham (USA)

Hera cell 240; Thermo Scientific, Waltham (USA)

Tecan Infinita 200, Magellan V6.6 Tecan, Grödig (A)

Adobe Systems GmbH, München (D)

Wayne Rasband, NIH, Bethesda (USA)

Carl Zeiss, Göttingen (D)

Microsoft Corporation, One Microsoft Way, Redmond (USA)

Cellstar (75 cm<sup>2</sup>, 250 ml); Greiner bio-one, Frickenhausen (D)

Filter Tip; Greiner bio-one, Frickenhausen (D)

48 well/96 well; Greiner bio-one, Frickenhausen (D)

Aufbewahrungsgefäß	Falcon Blue max (15 ml, 50 ml); BD, Franklin Lakes (USA)
Eppendorfgefäße	(0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml); Eppendorf AG, Hamburg (D)
Zählkammer	Neubauer; Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda Königshofen (D)
Objektträger	Super Frost; Menzel-Gläser, Braunschweig (D)
Pipetten	Eppendorf PhysioCare; Eppendorf AG, Hamburg (D)
Pipetten	Falcon serological (5 ml); BD, Franklin Lakes (USA)
REM Stiftprobenteller	Plano, Wetzlar (D)
REM Klebefolien	Plano, Wetzlar (D)
Prüfkörper / Titanprobekörper	Friadent, Mannheim (D)
<b>Chemikalien</b>	
Trypanblau	Trypan Blue Stain 0,4%, Gibco; Invitrogen, Carlsbad (USA)
Trypsin / EDTA	0,05% / 0,02% in PBS; Biochrom AG, Berlin (D)
PBS	Phosphate buffered saline, PAA Laboratories, Pasching (A) Gibco BRL, Grand Island, NY (USA)
Antibiotika	Penicillin und Streptomycin; Biochrom AG, Berlin (D)
Amphotericin B	Biochrom AG, Berlin (D)
Ethanolreihe	(30-50-70-96)
Osmiumtetroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
DMSO	Dimethylsulfoxid, Merck AG, Darmstadt (D)
HMDS	Hexamethyldisilazan; Merck AG, Darmstadt (D)
Glutaraldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) <sub>x</sub> ; Roche, Grenzach-Wyhlen (D)

Bovines Serum Albumin (BSA)	1% in PBS, Gibco; Invitrogen, Carlsbad (USA)
Phalloidin, from <i>Amanita phalloides</i> (P2141)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
DAPI	4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid; Roche, Grenzach-Wyhlen (D)
Tween 20	Poly(oxyethylen) <sub>x</sub> -Sorbitan-Monolaurat; Roche, Grenzach-Wyhlen (D)
Anti Mouse IgG	RD Systems, Minneapolis (USA)
Monoclonal Anti-Vinculin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
FBS	Fetal bovine serum, Biochrom AG, Berlin (D)
DMEM / Ham's F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, PAA, Velizy-Villacoublay (F)
Alkaline Phosphatase Assay Kit	Biovision, Mountain View, Kalifornien (USA)
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, Grenzach-Wyhlen, (D)